

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 762 850

②1 N° d'enregistrement national : 97 05699

⑤1 Int Cl⁶ : C 12 N 15/12, C 12 N 15/82, 1/21, A 01 H 5/00, C 07 K
14/79, A 61 K 6/00, 38/40, 35/78

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 02.05.97.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 06.11.98 Bulletin 98/45.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : BIOCEM SOCIETE ANONYME — FR.

⑦2 Inventeur(s) : LEGRAND DOMINIQUE, SALMON
VALERIE, SPIK GENEVIEVE, GRUBER
VERONIQUE, BOURNAT PHILIPPE et MEROT BER-
TRAND.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : BREESE MAJEROWICZ.

⑤4 LACTOFERRINES RECOMBINANTES, LEURS PROCEDES DE PRODUCTION PAR LES PLANTES AINSI QUE
LEURS UTILISATIONS.

⑤7 Utilisation d'une séquence nucléotidique recombinan-
te contenant, d'une part, un ADNc codant pour une lactofer-
rine, notamment la lactoferrine humaine, ou les protéines
dérivées et d'autre part, les éléments permettant à une cel-
lule végétale de produire la lactoferrine ou les protéines dé-
rivées, codées par ledit ADNc, notamment un promoteur et
un terminateur de transcription reconnus par la machinerie
transcriptionnelle des cellules végétales, pour la transfor-
mation de cellules de plantes en vue de l'obtention, à partir
de ces cellules, ou de plantes obtenues à partir de ces der-
nières, de lactoferrine ou des protéines dérivées.

FR 2 762 850 - A1



La présente invention concerne des lactoferrines recombinantes (rLf), leurs procédés de production par les plantes ainsi que leurs utilisations.

5 On connaît dans l'art antérieur la publication de Mitra et al (1994) qui décrit la transformation de cellules de tabac avec la séquence d'ADN codant pour la lactoferrine humaine. Cependant, cette publication est limitée aux cellules végétales et ne permet d'obtenir des plantes régénérées à partir de ces cellules. En outre, la protéine exprimée n'est pas purifiée et semble de toute façon imparfaite puisque seul un fragment (48 kDa) est détecté au lieu de la protéine entière.

10 On connaît également dans l'art antérieur la demande WO 9637094 qui décrit l'obtention de plantes résistantes aux virus en les transformant avec un gène codant pour la lactoferrine. Cependant, dans ce document également, la protéine n'est pas purifiée et le seul indice de sa présence est un test Western blot.

15 La lactoferrine est une glycoprotéine de la famille des transferrines. Après sa découverte dans le lait de femme, la lactoferrine fut mise en évidence dans les laits de nombreuses autres espèces animales comme la vache, la chèvre, la truie, la souris et le cobaye, mais à des concentrations fort variables. Dans le lait de femme, la concentration de lactoferrine est de 1 à 2 g/l ; celle-ci est particulièrement élevée dans le colostrum puis diminue au cours de la lactation. Dans le lait, la lactoferrine est présente principalement
20 sous forme apo, c'est-à-dire non saturée en fer. La lactoferrine a, d'autre part, été découverte dans de nombreuses autres sécrétions telles que la salive, la bile, le suc pancréatique et les sécrétions de l'intestin grêle. On la retrouve dans la plupart des mucus comme les sécrétions bronchiques, les sécrétions vaginales, nasales et intestinales.

25 La lactoferrine est présente également dans les leucocytes neutrophiles polymorphonucléaires où elle est localisée dans les granules secondaires des cellules ne possédant pas de myéloperoxydase. La lactoferrine leucocytaire est synthétisée au cours de la granulopoïèse du stade promyélocytaire au stade métamyélocytaire. Lors de la dégranulation des neutrophiles, la lactoferrine se retrouve libérée dans le plasma à une concentration relativement faible (0,4 à 2 mg/l), comparativement au taux de transferrine
30 présente dans le sang (2 à 3 g/l).

Dès 1984, Metz-Boutigue *et al.* ont déterminé la séquence peptidique de la lactoferrine humaine (hLf). Cette séquence de 692 acides aminés a été confirmée par le clonage de l'ADNc de la lactoferrine de glande mammaire humaine (Powell et Ogden, 1990, Rey *et al.*, 1990). La lactoferrine et la sérotransferrine possèdent une structure
35 primaire et une conformation spatiale très proches. Ainsi, leur chaîne polypeptidique est formée de 2 lobes (lobe N terminal et lobe C terminal) reliés par un petit peptide en hélice alpha. Les homologies de séquence entre les moitiés N et C terminales de la

lactoferrine humaine atteignent 37%. Par hydrolyse trypsique de la lactoferrine humaine, Legrand *et al.* (1984) ont obtenu le fragment N trypsique (N-t) de 30 kDa (résidus d'acides aminés 4 à 283), et le fragment C trypsique (C-t) de 50 kDa (résidus d'acides aminés 284 à 692). En proportion équimolaire, ces fragments sont capables de se réassocier en un complexe non covalent N-t / C-t qui possède des propriétés électrophorétiques et spectroscopiques voisines de celle de la lactoferrine humaine (Legrand *et al.*, 1986).

La lactoferrine peut fixer de manière réversible 2 ions ferriques en développant une coloration rose saumon dont le maximum d'absorption est centré à 465 nm. La fixation de chaque ion ferrique nécessite celle d'un ion carbonate. A pH 6,4, la constante d'association pour le complexe $[Fe^{3+}]_2-Lf$ est de l'ordre de $10^{24} M^{-1}$ mais diminue avec le pH. Des études par diffraction des rayons X de la lactoferrine humaine à 3,2 Å, à 2,8 Å et à 2,2 Å ont montré que chaque ion ferrique est coordonné à 2 résidus de tyrosine, une histidine, un acide aspartique et un ion carbonate. Ces acides aminés sont les mêmes dans chacun des 2 lobes. Les 2 sites de fixation du fer de la lactoferrine possèdent une forte affinité pour ce métal mais le libèrent à des pH différents. Ainsi, le lobe N-t libère son fer à pH 5,8 (lobe acido labile), alors que le lobe C-t (lobe acido-stable) relargue son fer à pH 4. D'autres ions sont susceptibles de se fixer à la protéine, en particulier le gallium. Des chercheurs se sont intéressés à l'utilisation du complexe $^{67}Ga-Lf$ comme traceur dans les diagnostics anti-cancer et ont montré qu'après injection de ^{67}Ga , le complexe se retrouve préférentiellement dans les tissus mammaires, dans les sécrétions physiologiques et pathologiques, ainsi que dans les lymphomes de Burkitt et Hodgkin.

En ce qui concerne la glycosylation, la lactoferrine isolée du lait de femme porte 3 sites de glycosylation qui sont l'Asn¹³⁸, l'Asn⁴⁷⁹ et l'Asn⁶²⁴, le premier étant situé dans le lobe N-t et les deux autres dans le C-t. La glycosylation s'effectue préférentiellement sur 2 sites (Asn¹³⁸ et Asn⁴⁷⁹) dans 85 % des molécules alors que la glycosylation d'un site (Asn⁴⁷⁹) et des trois sites simultanément se produit dans 5 et 9 % des cas respectivement. Les glycanes de la lactoferrine sont de type N-acétyllactosaminique mono ou disialylés et fucosylés (Spik *et al.*, 1982). Les résidus de fucose sont branchés en α (1,6) sur la N-acétylglucosamine du point d'attache ou en α (1,3) sur la N-acétylglucosamine 5' de l'antenne. La lactoferrine leucocytaire diffère de la précédente par l'absence totale de fucose.

Alors que la sérotransferrine est incontestablement le principal transporteur de fer de l'ensemble des cellules de l'organisme, les rôles de la lactoferrine paraissent essentiellement liés à la défense de l'organisme et aux mécanismes inflammatoires, en agissant soit directement sur les micro-organismes pathogènes, soit indirectement sur les cellules immunitaires effectrices.

La lactoferrine est un agent antimicrobien dont l'action met en jeu plusieurs mécanismes. Le premier est l'effet bactériostatique de la lactoferrine par ferriprivation (Spik *et al.*, 1978). En séquestrant le fer du milieu environnant, la lactoferrine inhibe la division des bactéries, le fer étant un élément indispensable à la biosynthèse de l'ADN.

5 De plus, un mécanisme d'action plus complexe faisant intervenir des anticorps a été démontré. En effet, l'activité bactériostatique de la lactoferrine augmente en présence d'IgA et d'IgG spécifiques des bactéries pathogènes. D'autre part, le lysozyme peut associer son activité lytique pour les parois des bactéries Gram + à l'action de la lactoferrine. Ainsi, dans le lait, la lactoferrine, le lysozyme et les anticorps peuvent agir
10 en synergie lors d'une attaque microbienne.

Le second effet antibactérien de la lactoferrine est lié à son pouvoir bactéricide. La lactoferrine se fixerait à la paroi des bactéries Gram- ce qui la déstabiliserait et provoquerait une libération des lipopolysaccharides (LPS). Les parois deviendraient ainsi plus fragiles et plus sensibles à l'action d'antibiotiques hydrophobes. Ces hypothèses ont
15 été confirmées par l'utilisation de la microscopie électronique qui montre l'effet déstabilisateur de la lactoferrine sur les bactéries Gram-, dont *E. coli*. Une hypothèse a été émise selon laquelle la fixation de la lactoferrine s'effectuerait sur le lipide A des LPS, et qu'elle serait suivie par l'extraction de ces LPS de la membrane externe des bactéries, en les endommageant irrémédiablement. La région bactéricide de la
20 lactoferrine humaine (lactoferricine A) et bovine (lactoferricine B) a été identifiée récemment : elles sont toutes deux localisées dans une boucle du lobe N-terminal, comprenant 18 acides aminés, boucle formée par un pont disulfure entre les résidus de Cys 20 et 37 pour la lactoferrine humaine et 19 à 36 pour la lactoferrine bovine. En outre, l'importance de la boucle formée par les résidus 28-34 de la lactoferrine humaine
25 dans sa fixation aux LPS a été montrée.

Ainsi, par ses activités bactériostatique et bactéricide, la lactoferrine présente dans le lait de femme protège le nourrisson des diarrhées infantiles.

Un effet antifongique de la lactoferrine humaine a été établi sur plusieurs souches de *Candida*. Des études ont également été réalisées avec la lactoferrine bovine et ont
30 démontré cette action à la fois sur des levures et sur des champignons filamenteux. L'effet de la lactoferricine bovine serait d'ailleurs supérieur à celui de l'apolactoferrine bovine entière et similaire à celui de la polymyxine B, un antibiotique de type peptide cationique connu pour ses propriétés de destabilisation des membranes. Il a été également démontré que la lactoferricine B interagit directement à la surface du
35 champignon en induisant ainsi des modifications de son ultrastructure.

Récemment, plusieurs auteurs ont mis en évidence une activité antivirale de la lactoferrine humaine. En effet, certains types de virus pénètrent dans la cellule par un

mécanisme qui fait intervenir une adsorption des protéoglycannes des membranes des cellules cibles, suivie d'une fixation à un récepteur spécifique et par la fusion de la membrane virale avec celle de l'hôte. La lactoferrine se fixant aux héparanes sulfates des cellules grâce à sa forte basicité est ainsi capable d'inhiber l'adsorption de plusieurs types
5 de virus. Des études *in vitro* très concluantes ont été réalisées avec le virus HIV (human immunodeficiency virus) et avec HCMV (human cytomegalovirus) avec une CI_{50} de l'ordre de 40µg/ml. Des résultats semblables ont été obtenus avec le virus HSV-1 (herpes simplex virus type 1). Ces derniers travaux ont mis en évidence non seulement un blocage des récepteurs du virus (héparanes sulfates, protéoglycannes, récepteur LDL)
10 mais aussi une possible interaction entre la lactoferrine et le virus. Ces rôles récemment découverts représentent une nouvelle voie dans la prévention et la thérapie, en particulier pour les malades immunodéficients ou récidivistes vis à vis de ces infections virales.

Une des conséquences de l'inflammation d'un tissu est la formation de radicaux libres et la peroxydation des lipides. La formation de ces radicaux libres provient
15 notamment des mécanismes de phagocytose de micro-organismes. Selon la réaction d'Haber-Weiss, les radicaux libres sont engendrés grâce au fer ferrique qui agit comme catalyseur de la réaction. Il a été démontré *in vivo* que la lactoferrine provenant de la dégranulation des neutrophiles stoppe la formation des radicaux libres extra-cellulaires en séquestrant immédiatement le fer qui catalyserait la formation de ces radicaux. Par
20 cette action, la lactoferrine évite que les tissus ne soient endommagés. Par un mécanisme analogue, la lactoferrine inhibe la peroxydation des lipides et protège ainsi les membranes cellulaires sur lesquelles elle se fixe. Ces études ont ainsi démontré que la lactoferrine possède une activité anti-oxydante et anti-inflammatoire à la condition que la protéine soit sous sa forme privée de fer.

25 La lactoferrine libérée par les granules leucocytaires a été identifiée comme un inhibiteur de la production des colonies de granulocytes et de macrophages en diminuant la production de GM-CSF (facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages). Le mécanisme mis en jeu semble complexe puisque la lactoferrine agirait en inhibant la libération d'une monokine responsable elle-même de la libération du GM-
30 CSF par les lymphocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales. Cette monokine a été identifiée à l'IL1.

De nombreux rôles de la lactoferrine, comme la suppression de la production d'anticorps, la régulation de l'activation du complément ou encore la régulation de l'activité des cellules NK (Natural Killer), impliquent des mécanismes qui sont régulés
35 par des cytokines. Des études montrent que la lactoferrine peut exercer un rétrocontrôle négatif sur certaines cytokines comme l'IL1, l'IL2, et le TNFα afin d'empêcher la mobilisation et l'activation des leucocytes sur le lieu de l'inflammation.

Zimecki *et al.*, (1991) ont démontré que des thymocytes immatures CD4- CD8- incubés en présence de lactoferrine acquièrent le marqueur CD4+ caractéristique des lymphocytes auxiliaires. Ces auteurs mettent également en évidence différents changements phénotypiques et fonctionnels de cellules B mis en présence de lactoferrine (Zimecki *et al.*, 1995). Un récepteur spécifique de la lactoferrine humaine a été caractérisé sur les lymphocytes activés (Mazurier *et al.*, 1989). Par ailleurs, le site d'interaction de la lactoferrine avec son récepteur lymphocytaire a été décrit : Legrand *et al.* (1992) ont démontré qu'il était compris dans la région N terminale, et plus précisément dans les 50 premiers résidus de la lactoferrine.

10 La lactoferrine semble réguler l'activité cytotoxique des cellules NK (Natural Killer et des cellules LAK à des doses très faibles (0,75 µg/ml). La lactoferrine augmente de manière significative l'activité cytotoxique des cellules NK vis à vis des cellules tumorales et des cellules infectées par les rétrovirus. La lactoferrine agit aussi sur la cytotoxicité des monocytes. La cause de cette stimulation par la lactoferrine de l'activité
15 cytotoxique des cellules NK, des lymphocytes mais aussi des cellules adhérentes peut être la conséquence, soit d'une activation des cellules tueuses à la suite de l'internalisation de la lactoferrine, soit d'une modification des cellules cibles qui deviendraient alors plus sensibles à la lyse.

La lactoferrine exerce une activité facteur de croissance sur différentes cellules dans un milieu dépourvu de sérum de veau foetal. Cette activité a été mise en évidence
20 notamment sur des lignées lymphocytaires humaines B et T et vis à vis d'une lignée murine macrophagique (P388 DI). La lactoferrine stimule également l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN de cellules entérocytaires de rat.

Le rôle du fer dans l'activité facteur de croissance reste encore controversée : selon certains auteurs, la lactoferrine interviendrait en apportant le fer nécessaire à la
25 prolifération cellulaire ; pour d'autres, le fer ne jouerait aucun rôle, l'activité mitogène n'étant due qu'à la protéine elle-même.

L'hypothèse que la lactoferrine est impliquée dans l'absorption intestinale du fer est venue de l'observation que chez les nourrissons alimentés au lait maternel, l'incidence
30 de la carence en fer est très faible. De même, seuls ces enfants maintiennent un important stock de fer jusqu'à l'âge de 6 mois, ce qui suggère une grande biodisponibilité du fer contenu dans le lait de femme. Ainsi, le pourcentage d'absorption peut atteindre 81% au cours des trois premiers mois de la vie puis diminue rapidement. Parmi les différents constituants du lait de femme, la lactoferrine est le meilleur candidat pour expliquer,
35 d'une part, l'importante bio-disponibilité du fer du lait et d'autre part, la régulation de cette absorption. Cox *et al.* ont étudié dès 1979 l'implication de la lactoferrine sur l'absorption du fer par l'intestin humain. Le récepteur entérocytaire de la lactoferrine a

- été mis en évidence pour la première fois chez le lapin, puis chez la souris. Enfin, le récepteur entérocytaire humain a été étudié et il a été montré sur des cultures de cellules entérocytaires HT29 que le nombre de récepteurs de lactoferrine était doublé en présence de chélateur de fer (Mikogami *et al.*, 1994, 1995). Cette augmentation est due à une synthèse *de novo* de récepteurs. L'expression du récepteur de la lactoferrine est donc régulée par le manque de fer et cette carence induit également une augmentation de l'internalisation du récepteur de la lactoferrine par les entérocytes. Ainsi, le récepteur de la lactoferrine semble jouer un rôle dans la nutrition martiale en particulier en cas de carence en fer.
- 10 Ainsi, les nombreux rôles de la lactoferrine, et notamment ses activités anti-oxydantes, antimicrobiennes et antivirales donnent un intérêt majeur à cette protéine en terme de thérapie mais surtout de prophylaxie d'infections bactériennes, fongiques et virales mais aussi en ce qui concerne la prévention des chocs septiques survenants classiquement après une opération chirurgicale.
- 15 La lactoferrine peut également être utilisée dans une méthode de traitement dermopharmaceutique et cosmétique, par exemple dans un traitement cosmétique anti-radicaux libres ou pour protéger la kératine des cheveux contre les agressions atmosphériques.
- 20 **DESCRIPTION DETAILLE DE L'INVENTION:**
- L'invention concerne :
- l'utilisation d'une séquence nucléotidique recombinante contenant, d'une part, un ADNc codant pour une lactoferrine, notamment la lactoferrine humaine, ou les protéines
- 25 dérivées (on entend par protéine dérivée toute protéine présentant au moins 70 % d'homologie avec la protéine de référence, notamment au moins 80%, par exemple entre 85 et 100% d'homologie et/ou présentant un profil de glycosylation différent tout en conservant les caractéristiques fonctionnelles de la lactoferrine de référence), et d'autre
- 30 part, les éléments permettant à une cellule végétale de produire la lactoferrine ou les protéines dérivées, codées par ledit ADNc, notamment un promoteur et un terminateur de transcription reconnus par la machinerie transcriptionnelle des cellules végétales, pour la transformation de cellules de plantes en vue de l'obtention, à partir de ces cellules, ou de plantes obtenues à partir de ces dernières, de lactoferrine ou des protéines dérivées,
- 35 - une séquence nucléotidique recombinante, caractérisée en ce qu'elle contient d'une part la séquence codante pour la lactoferrine , notamment la lactoferrine humaine, ou les protéines dérivées et d'autre part, les éléments permettant à une cellule végétale de produire la lactoferrine ou les protéines dérivées codées par ladite séquence, notamment

un promoteur et un terminateur de transcription reconnus par la machinerie transcriptionnelle des cellules végétales.

-un vecteur, notamment un plasmide, contenant une séquence nucléotidique selon l'invention insérée le cas échéant en un site non essentiel pour sa répllication.

5 -un hôte cellulaire, notamment toute bactérie telle que *Agrobacterium tumefaciens*, transformé par un vecteur selon l'invention,

-un procédé d'obtention de lactoferrine, notamment la lactoferrine humaine, ou des protéines dérivées, caractérisé en ce qu'il comprend :

10 - la transformation de cellules végétales, notamment à l'aide d'un hôte cellulaire selon l'invention, lui-même transformé par un vecteur selon l'invention, de manière à intégrer dans le génome de ces cellules une séquence recombinante selon l'invention,

- le cas échéant, l'obtention de plantes transformées à partir des cellules transformées susmentionnées,

15 - la récupération de la lactoferrine, notamment la lactoferrine humaine, ou des protéines dérivées recombinantes produits dans lesdites cellules ou plantes transformées susmentionnées, notamment par extraction, suivie, le cas échéant, par une purification,

20 -une plante, un extrait de plante ou une partie de plante, notamment feuilles et/ou fruits et/ou semences et/ou cellules de plantes, transformés génétiquement, caractérisée en ce qu'elle contient une (ou plusieurs) séquence(s) nucléotidique(s) recombinante(s) selon l'invention, intégrée(s) de façon stable dans leur génome, ces plantes étant choisies notamment parmi le colza, le tabac, le maïs, le pois, la tomate, la carotte, le blé, l'orge, la pomme de terre, le soja, le tournesol, la laitue, le riz, la luzerne, et la betterave,

25 -une lactoferrine, notamment une lactoferrine humaine, ou protéine dérivée caractérisée en ce qu'elle est obtenue selon le procédé de l'invention,

30 - une plante, un extrait de plante ou une partie de plantes, notamment feuilles et/ou fruits et/ou semences et/ou cellules de plantes, transformés génétiquement, caractérisés en ce qu'ils contiennent une lactoferrine, notamment la lactoferrine humaine, ou une protéine dérivée selon l'invention, ces plantes étant choisies notamment parmi le colza, le tabac, le maïs, le pois, la tomate, la carotte, le blé, l'orge, la pomme de terre, le soja, le tournesol, la laitue, le riz, la luzerne, et la betterave.

35 -l'utilisation de plantes, extraits de plantes ou parties de plantes selon l'invention, et/ou de protéines (lactoferrine, notamment la lactoferrine humaine, ou protéine dérivée) selon l'invention, pour l'obtention de compositions pharmaceutiques, médicales, odontologiques, cosmétiques ou biotechnologiques,

-un Biomatériau et une composition pharmaceutique, médicale, odontologique, cosmétique ou biotechnologique. caractérisée en ce qu'elle comprend des plantes,

extraits de plante, parties de plantes et/ou de protéines (lactoferrine, notamment la lactoferrine humaine, ou protéine dérivée) selon l'invention.

- Une composition pharmaceutique selon l'invention comprend notamment toute composition selon l'invention constituant (ou entrant dans la fabrication d') une composition permettant de prévenir ou de traiter une pathologie ou un symptôme d'origine bactérienne, fongique ou virale, une inflammation ou une pathologie ayant une composante inflammatoire, les chocs septiques, une pathologie liée à un phénomène de croissance cellulaire ou à une carence en fer.
- Une composition cosmétique selon l'invention comprend notamment toute composition selon l'invention constituant (ou entrant dans la fabrication de) un additif pour préparation (crèmes, pommades, fards, onguents).

- Avantageusement, les séquences nucléotidiques recombinantes selon l'invention contiennent une (ou plusieurs) séquence(s) codant pour un peptide responsable de l'adressage des polypeptides recombinants dans un compartiment déterminé de la cellule végétale, notamment dans le réticulum endoplasmique ou dans les vacuoles, ou bien même à l'extérieur de la cellule, dans la paroi pectocellulosique ou dans l'espace extracellulaire aussi appelé apoplasme.

- Parmi les terminateurs de transcription susceptibles d'être utilisés pour la transformation de cellules de plantes dans le cadre de la présente invention, on peut citer le terminateur polyA 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV), ou le terminateur polyA NOS, qui correspond à la région en 3' non codante du gène de la nopaline synthase du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* souche à nopaline .

- A ce titre, l'invention a pour objet toute séquence nucléotidique recombinante telle que décrite ci-dessus contenant en aval dudit ADNc ou de sa séquence dérivée, le terminateur polyA 35S du CaMV, ou le terminateur polyA NOS d'*Agrobacterium tumefaciens*.

- Parmi les promoteurs de transcription susceptibles d'être utilisés pour la transformation de cellules de plantes dans le cadre de la présente invention, on peut citer :
- le promoteur 35S (P35S), ou avantageusement le promoteur constitutif double 35S (Pd35S) du CaMV, ces promoteurs permettant l'expression des polypeptides recombinants de l'invention dans l'ensemble de la plante obtenue à partir de cellules transformées selon l'invention, et sont décrits dans l'article de Kay *et al.*, 1987,
 - le promoteur PCRU du gène de la cruciférine de radis permettant l'expression des polypeptides recombinants de l'invention uniquement dans les semences (ou graines) de la plante obtenue à partir de cellules transformées selon l'invention, et décrit dans l'article de Depigny-This *et al.*, 1992,

les promoteurs PGEA1 et PGEA6 correspondant à la région 5' non codante des gènes de la protéine de réserve de graines, GEA1 et GEA6, respectivement, d'*Arabidopsis thaliana* (Gaubier et al., 1993), et permettant une expression spécifique dans les graines,

- le promoteur chimérique super-promoteur PSP (Ni M et al., 1995), constitué de la fusion d'une triple répétition d'un élément activateur transcriptionnel du promoteur du gène de l'octopine synthase d'*Agrobacterium tumefaciens*, d'un élément activateur transcriptionnel du promoteur du gène de mannopine synthase et du promoteur mannopine synthase d'*Agrobacterium tumefaciens*,
 - le promoteur actine du riz suivi de l'intron actine de riz (PAR-IAR) contenu dans le plasmide pAct1-F4 décrit par McElroy et al. (1991),
 - le promoteur HMGW (High Molecular Weight Glutenine) d'orge (Anderson O.D. et al, 1989),
 - le promoteur du gène de γzéine de maïs (Pyzéine) contenu dans le plasmide py63 décrit dans Reina et al. (1990), et permettant l'expression dans l'albumen des semences de maïs.
- 15 A ce titre, l'invention a pour objet toute séquence nucléotidique recombinante telle que décrite ci-dessus, contenant en amont dudit ADNc ou de sa séquence dérivée, le promoteur constitutif double 35S (Pd35S) du CaMV, ou le promoteur PCRU du gène de la cruciférine de radis, ou les promoteurs PGEA1 ou PGEA6 d'*Arabidopsis thaliana*, ou le super-promoteur PSP d'*Agrobacterium tumefaciens*, ou le promoteur PAR-IAR du riz,
- 20 le promoteur HMGW d'orge ou le promoteur pyzéine du maïs.

Les séquences codant pour un peptide d'adressage utilisées dans le cadre de la présente invention, peuvent être d'origine végétale, humaine ou animale.

Parmi les séquences codant pour un peptide d'adressage d'origine végétale, on peut citer:

- la séquence nucléotidique de 69 nucléotides (indiquée dans les exemples qui suivent) codant pour le prépeptide (peptide signal) de 23 acides aminés de la sporamine A chez la patate douce, ce peptide signal permettant l'entrée des polypeptides recombinants de l'invention dans le système de sécrétion des cellules végétales transformées selon l'invention (à savoir principalement dans le réticulum endoplasmique),
- la séquence nucléotidique de 42 nucléotides (indiquée dans les exemples qui suivent) codant pour le propeptide N-terminal d'adressage vacuolaire de 14 acides aminés de la sporamine A chez la patate douce, permettant l'accumulation des polypeptides recombinants de l'invention dans les vacuoles des cellules végétales transformées selon l'invention,
- la séquence nucléotidique de 111 nucléotides (indiquée dans les exemples qui suivent) codant pour le prépropeptide de 37 acides aminés de la sporamine A constitué de la partie N-terminale vers la partie C-terminale des 23 acides aminés du peptide signal susmentionné suivis par les 14 acides aminés du propeptide susmentionné, ce prépropeptide permettant l'entrée de polypeptides recombinants de l'invention dans le

système de sécrétion et leur accumulation dans les vacuoles des cellules végétales transformées selon l'invention,

les trois séquences susmentionnées étant décrites dans les articles de Murakami *et al.*, 1986, et Matsuoka *et al.*, 1991,

- 5 - le propeptide carboxyterminal de la lectine d'orge décrit notamment dans les articles de Schroeder *et al.*, 1993, et de Bednarek *et al.*, 1991,
- et le PRS (Pathogenesis Related Protein, Cornelissen *et al.* 1986) permettant la sécrétion.

- On peut également citer, parmi les séquences codant pour un peptide d'adressage, celle
- 10 codant pour les peptides KDEL, SEKDEL et HDEL et permettant un adressage dans le réticulum endoplasmique.

- L'invention a également pour objet toute séquence nucléotidique recombinante telle que décrite ci-dessus, contenant une séquence codant pour tout ou partie d'un peptide d'adressage vacuolaire, notamment celui de la sporamine A de la patate douce, cette
- 15 séquence codant pour un peptide d'adressage vacuolaire étant située, dans ladite séquence nucléotidique recombinante, entre la séquence codant pour un peptide signal et celle codant pour ledit ADNc ou sa séquence dérivée, de telle sorte que le premier acide aminé N-terminal du peptide d'adressage vacuolaire soit lié au dernier acide aminé C-terminal du peptide signal, et que le dernier acide aminé C-terminal dudit peptide
- 20 d'adressage soit lié au premier acide aminé N-terminal du polypeptide codé par ledit ADNc ou sa séquence dérivée, dans la protéine codée par ladite séquence nucléotidique recombinante.

- L'invention a également pour objet toute séquence nucléotidique recombinante telle que décrite ci-dessus, contenant une séquence codant pour tout ou partie d'un peptide
- 25 d'adressage vacuolaire, notamment celui de la lectine d'orge, cette séquence codant pour un peptide d'adressage vacuolaire étant située, dans ladite séquence nucléotidique recombinante, en aval de la séquence codant pour ledit ADNc ou sa séquence dérivée, de telle sorte que le premier acide aminé N-terminal du peptide d'adressage vacuolaire soit lié au dernier acide aminé C-terminal du polypeptide codé par ledit ADNc ou sa
- 30 séquence dérivée, dans la protéine codée par ladite séquence nucléotidique recombinante.

EXEMPLES

EXEMPLE 1 : Construction du plasmide pBS-Lf renfermant l'ADNc complet codant la lactoferrine humaine.

- La lactoferrine est synthétisée sous la forme d'une pré-protéine dans laquelle la
- 35 séquence codant pour la protéine mature de 692 acides aminés est précédée d'un peptide signal de 19 acides aminés (PSLf), de séquence MKLVFLVLLFLGALGLCLA.

L'ADNc entier contenant la séquence de ce peptide signal, a été utilisé dans ce travail. Il a été isolé à partir d'une banque d'ADNc de glande mammaire humaine

(Clontech, ref HL1037b, CA, USA) construite dans le vecteur λ gt11. La banque a été criblée grâce à une sonde oligonucléotidique correspondant aux acides aminés du peptide signal (c'est-à-dire les acides aminés 1 à 19 de la hLf immature dite aussi pré-lactoferrine humaine) de la Lf par la technique d'hybridation sur réplique de nitrocellulose.

- 5 Brièvement, les clones sont fixés dans un bain de NaOH 0,5M, NaCl 1,5M, pendant deux min avant d'être neutralisés dans une solution de NaCl 1,5 M, Tris-HCl 0,5 M, pH 7,4 durant 5 min. Les filtres sont alors rincés par du 2X SSC (17,5g/l NaCl, 8,8g/l citrate trisodique, QSP 11). L'ADN est finalement fixé par cuisson 2h à 80°C. L'hybridation a été réalisée à l'aide de la sonde oligonucléotidique décrite ci-dessus marquée au ^{32}P , à
- 10 raison de 10^6 cpm/ml de solution d'hybridation (6X SSC, 10X Denhardt, 0,1% (p/v) nonidet NP40 (octyl phenoxypolyethoxyethanol, Sigma), 100 μ g/ml d'ADN de sperme de saumon) durant une nuit, à 65°C. Les répliques sont alors lavées 4 fois dans un solution de 2X SSC, 0,1%SDS à 42°C, avant d'être placés en exposition.

- 15 Par hydrolyse ménagée de λ gt11 par EcoRI (3 U/ μ g d'ADN pendant 2 min à 37°C), l'ADNc entier de la Lf a été cloné dans le plasmide pBluescript SK (Stratagène, La Jolla, USA) au site EcoRI, conduisant ainsi au plasmide **pBS-Lf**.

EXEMPLE 2 : Construction du plasmide pBS-12 renfermant l'ADNc complet codant la lactoferrine humaine modifié en son extrémité 3'.

- 20 Une modification en 3' de l'ADNc de la lactoferrine humaine a été opérée afin de pouvoir fusionner la séquence située en aval du codon stop avec le terminateur contenu dans pBIOC21, décrit ultérieurement. Par PCR, cette modification a permis de supprimer le site naturel de restriction EcoRI (GAATTC) en amont du codon stop, d'en créer un 9 paires de bases en aval, suivi d'un site XbaI (TCTAGA).

- 25 Cette PCR sur matrice pBS-Lf a été effectuée grâce au jeu d'oligodésoxynucléotides suivant :

oligo 5' : 5' ATGACAACACTGAGTGTCTGGCC 3' (correspondant aux acides nucléiques 1991 à 2011, c'est-à-dire aux acides aminés 664 à 671 de la hLf immature)

- 30 oligo 3' : 5'CCGTCTAGAGAATTCGTTTTACTTCCTGAGGAGTTCAC 3', qui contient les sites de mutations (oligonucléotide chevauchant le codon stop, correspondant à l'acide aminé 711 de la hLf immature).

Conditions de PCR :

- 35 Les réactifs utilisés lors des différentes PCR sont fournis par Promega (Charbonnière, France), les oligodésoxynucléotides sont synthétisés par Eurogentec

(Seraing, Belgique). Dans chaque cas, 5 ng de matrice sont incubés en présence de 100 pmol de chacun des deux oligodésoxynucléotides, 3 µl de dNTP 10 mM, 6 µl de MgCl₂ 25 mM, 0,5 µl (2,5 U) de Taq DNA polymérase, dans un volume final de 100 µl comprenant le tampon du fournisseur.

- 5 La PCR a été réalisée par un bio-med THERMOCYCLER 60 (B. Braun). La première dénaturation a eu lieu 5 min à 94 °C. Elle a été suivie de 30 cycles comprenant chacun 1 min à 94 °C, 1 min à (T_m-10 °C soit 50°C) et 1 min à 72 °C. Pour terminer, une dernière phase d'élongation de 5 min à 72 °C a été effectuée.

- 10 Le produit issu de cette PCR contient le site unique NdeI (acide aminé 678 de la hLf immature) de l'ADNc de la lactoferrine. Ainsi, ce fragment a été hydrolysé par XbaI et NdeI et sous-cloné dans pBS-Lf délété du fragment NdeI-XbaI, ce qui a permis l'obtention du plasmide pBS-12.

- 15 Les conditions de ligation ont été les suivantes: 100ng de plasmides et 100ng d'inserts ont été incubés 1 nuit à 16°C, en présence de 4U de T4 DNA ligase (Stratagene), dans le tampon et les conditions préconisés par le fournisseur, soit dans un volume final de 50µl contenant entre autre 1µl d'ATP 10 mM. Ces conditions ont été utilisées pour toutes les réactions de ligation décrites ci-après.

Le produit issu de la ligation a permis la transformation de bactéries DH5α préalablement rendues compétentes par la technique au Rubidium décrite ci-dessous.

- 20 Préparation des bactéries compétentes :

- 1 ml de culture de nuit de DH5α est remis en culture dans du milieu LB (10g/l de bactotryptone, (g/l de yeast extract, 5 g/l de NaCl) contenant du KCl (250 mM) et du MgSO₄ (16 mM) jusqu'à l'obtention d'une DO₆₅₀ de 0,3. La suspension bactérienne est alors centrifugée à 2500 rpm pendant 5 min à 4°C ; le culot est repris dans du tampon Tfb1 (RbCl 100mM, MnCl₂ 50 mM, CaCl₂ 10mM, KOAc 10mM, glycérol 15%, pH5,8 ajusté avec HOAc 0,2M), incubé sur la glace durant 15 min puis centrifugé de nouveau dans les mêmes conditions. Le culot est cette fois repris par 6,5 ml de tampon Tfb2 (MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM, Glycerol 15%, pH7 ajusté avec NaOH 0,5M). Les cellules sont alors réparties à raison de 200 µl par tube et stockées à -80°C pour les étapes ultérieures de transformation.

- 35 Lors de l'étape de transformation, les cellules sont décongelées sur la glace, la solution d'ADN (25 µl de la réaction de ligation, soit 50 ng d'ADN) est ajoutée à 200 µl de DH5α compétentes. La suspension est incubée 20 min sur la glace puis plongée dans un bain-marie à 42°C pendant 90 sec et replacée sur la glace durant 5 min. La suspension est remise en culture liquide dans du milieu LB pendant 1 h, puis étalée sur milieu LB

contenant le marqueur de sélection. Après une culture d'une nuit à 37°C, les clones sont analysés.

Cette technique a été utilisée pour toutes les transformations ultérieures.

- Après analyse des clones de pBS12, la séquence du fragment amplifié par PCR est confirmée par séquençage (Sanger *et al.*, 1975) de ce plasmide (Sequenase DNA sequencing kit, United States Biochemical Corporation, Cleveland, USA).

EXEMPLE 3 : Construction du plasmide pBS-14 dérivé de pBS-12 renfermant l'ADNc codant la lactoferrine humaine dont la séquence du peptide signal (PSLf) a été remplacée par celle du peptide signal de la sporamine de patate douce (PSSp).

- Premièrement, par PCR, un site Sall a été introduit en aval de XhoI dans l'ADNc de la Lf, au niveau du premier codon de la séquence de la protéine mature, afin de pouvoir fusionner avec la séquence codant le peptide signal de la sporamine de patate douce (PSSp ; Murakami *et al.*, 1986 ; Matsuoka *et al.*, 1991) permettant théoriquement la sécrétion. Le peptide signal de la sporamine de patate douce est constitué de 23 acides aminés de séquence : MKAFTLALFLALSLYLLPNPAHS.

Les oligodésoxynucléotides,

- oligo 5' : 5' TAACTCGAGGCCGGGTCGACGGAGAAGGAGTGTTCAGTG 3' contenant Sall (GTCGAC) et XhoI (CTCGAG); acides aminés 16 à 28 de la hLf immature,

et,

- oligo3' : 5' ACCCGTCCAATTCAAGAATGGACGAAG 3' contenant XcmI (CCAATTCAAGAATGG, acide aminé 153 de la hLf immature),

- ont été utilisés pour cette PCR sur matrice pBS-12 dans les conditions sont décrites précédemment. Le fragment issu de PCR a été hydrolysé par XhoI et XcmI. Il a été inséré aux sites XhoI et XcmI de pBS-12 en mettant en oeuvre les conditions de ligation décrites précédemment. La transformation a été réalisée comme décrite précédemment. Le plasmide résultant est appelé pBS-13. Sa séquence a été vérifiée par séquençage comme décrit précédemment.

- Deuxièmement, afin de fusionner l'ADNc du peptide signal de la sporamine à celui de la Lf mature, un site Sall (GTCGAC) a été introduit par PCR au niveau du dernier codon de la séquence du peptide de la sporamine, ainsi qu'un site XhoI (CTCGAG) suivi d'un site EcoRI immédiatement en amont du codon d'initiation ATG. Ces modifications ont été réalisées par PCR, sur matrice pMAT103 selon les

conditions décrites ci-dessus. Les oligodéoxynucléotides choisis ont permis l'insertion de ces différents sites de restriction :

oligo 5' : 5' TCCCTCGAGGAATTCATGAAAGCCTTCACACTC 3', et,

oligo 3' : 5' TCCGTCGACCGGAATGGGCTGGATTGGGCAGG 3'.

- 5 Après digestion du fragment amplifié par XhoI et Sal I, celui-ci a été sous-cloné dans pBS-13 préalablement hydrolysé par XhoI et SalI. Le plasmide résultant pBS-14 a été vérifié par séquençage des 500 premiers nucléotides de la protéine chimérique.

10 **EXEMPLE 4 : Construction de pBIOC21.**

L'expression dans les feuilles et les graines de tabac de l'ADNc codant la lactoferrine humaine a nécessité les séquences régulatrices suivantes:

1. le promoteur constitutif double 35S (Pd35S) du CaMV (virus de la mosaïque du chou-fleur). Il correspond à une duplication des séquences activant la transcription situées en amont de l'élément TATA du promoteur 35S naturel (Kay *et al.*, 1987);

- 15 2. la séquence terminatrice de transcription, terminateur polyA 35S (T35S), qui correspond à la région 3' non codante de la séquence du virus à ADN bicaténaire circulaire de la mosaïque du chou-fleur produisant le transcrit 35S (Franck *et al.*, 1980).

Les constructions des différents plasmides via l'utilisation des techniques d'ADN recombinant dérivent de pBIOC4. Le plasmide binaire dérive de pGA492 (An, 1986). Le plasmide dérivant de pBIOC4 et contenant la cassette d'expression "PD35S-T35S" est le plasmide pBIOC21.

20 Les différents éléments permettant de reproduire ces constructions sont par exemple contenus dans la description de la demande de brevet WO9633277 qui est incorporée par référence.

25

EXEMPLE 5 : Construction de pBIOC21-PSLf-Lf.

30 Le plasmide pBS-12 a été hydrolysé par EcoRI pour isoler le fragment de 2160 paires de bases correspondant à la séquence codant la lactoferrine humaine précédée de son peptide signal naturel. Ce fragment a été sous-cloné dans le plasmide binaire pBIOC21 préalablement linéarisé en EcoRI et déphosphorylé. Le plasmide binaire obtenu est appelé pBIOC21-PSLf-Lf.

35 La réaction de déphosphorylation est appliquée à 800 ng d'ADN en présence de 1U de CIP (Stratagene) dans le tampon du fournisseur, dans un volume de 40µl pendant 30 min

à 37°C. Les réactions de ligation et de transformation de la souche DH5 α d'*Escherichia coli* ont été réalisées comme mentionné ci-dessus.

L'ADN plasmidique de pBIOC21-PSLf-Lf a été introduit dans la souche LBA4404 d'*Agrobacterium tumefaciens* selon le procédé de Holsters (1978). La validité des clones retenus est vérifiée par digestion enzymatique de l'ADN plasmidique introduit.

EXEMPLE 6 : Construction de pBIOC21-PSSp-Lf

L'ADNc codant la protéine chimérique "PSSp-Lf" a été excisé de pBS-14 par hydrolyse par EcoRI. Ce fragment codant de 2150 paires de bases a été sous-cloné au site EcoRI déphosphorylé de pBIOC21. Le plasmide binaire obtenu est appelé pBIOC21-PSSp-Lf.

Les réactions de déphosphorylation, ligation, transformation de la souche DH5 α d'*Escherichia coli* ont été réalisées comme mentionné ci-dessus.

L'ADN plasmidique de pBIOC21-PSSp-Lf a été introduit dans la souche LBA4404 d'*Agrobacterium tumefaciens* selon le procédé de Holsters (1978). La validité des clones retenus est vérifiée par digestion enzymatique de l'ADN plasmidique introduit.

EXEMPLE 7 : Construction de pACT-IA-PSLf-Lf

L'expression constitutive dans les semences de maïs a nécessité les séquences régulatrices suivantes :

- promoteur actine de riz suivi de l'intron actine de riz (pAR-IAR) contenu dans le plasmide pAct1-F4 décrit par McElroy *et al.* (1991) ;
- la séquence terminatrice de transcription, terminateur polyA NOS, qui correspond à la région en 3' non codante du gène de la nopaline synthase du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* souche à nopaline (Depicker *et al.*, 1982).

Le plasmide pBSII-pAR-IAR-tNOS dans lequel a été inséré la séquence codant "PSLf-Lf" est décrit par exemple dans la demande de brevet WO9633277 qui est incorporée par référence.

La séquence codant "PSLf-Lf" a été isolée par digestion enzymatique EcoRI à partir de pBS-12. Le fragment digéré a été purifié par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8%, puis soumis à l'électroélution, à la précipitation alcoolique, séché, repris dans H2O. Il a été traité par action de l'enzyme Klenow (New England Biolabs) selon les recommandations du fabricant. Il a été inséré dans le plasmide pBSII-pAR-IAR-tNOS

digéré doublement par *SalI* et *NcoI*, purifié, traité à l'enzyme Mung Bean Nucléase (New England Biolabs) et déphosphorylé par l'enzyme phosphatase alcaline de veau (Boehringer Mannheim) selon les recommandations des fabricants. La ligation a été réalisée avec 20 ng du vecteur déphosphorylé et 200 ng de fragments d'ADN contenant la séquence codant pour "PSLf-Lf", décrits ci-dessus, dans un milieu réactionnel de 20 µl en présence de 2 µl de tampon T4 DNA ligase x 10 (Amersham), de 2 µl de 50% polyéthylène glycol 8000 et de 5 U d'enzyme T4 DNA ligase (Amersham) à 14°C pendant 16 heures. Les bactéries, *Escherichia coli* DH5α rendues préalablement compétentes, ont été transformées (Hanahan, 1983). L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur 50 µg/ml ampicilline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline (Birnboim et Doly, 1979) et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction. Le plasmide résultant a été appelé pACT-IA-PSLf-Lf.

15 **EXEMPLE 8 : Construction de pACT-IA-PSSp-Lf**

La construction pACT-IA-PSSp-Lf est similaire à pACT-IA-PSLf-Lf excepté que la séquence "PSLf-Lf" a été remplacée par celle codant "PSSp-Lf" correspondant au fragment *EcoRI* traité par l'enzyme Klenow (New England Biolabs), isolé à partir de pBS-14. Le plasmide résultant est appelé pACT-IA-PSSp-Lf.

20

EXEMPLE 9 : Construction de pgzéine-PSLf-Lf

L'expression dans l'albumen des semences de maïs a nécessité les séquences régulatrices suivantes :

- 25 - le promoteur du gène gamma (g) de zéine de maïs (Pgzéine) contenu dans le plasmide p63 décrit dans Reina *et al.*, 1990. Le plasmide p63 résulte du clonage de Pgzéine, en remplacement du promoteur 35S (P35S), aux sites *HindIII* et *XbaI* du plasmide pUC18 renfermant, entre ses sites *HindIII* et *EcoRI*, la cassette d'expression "P35S-gus-TNOS" de pBI221 commercialisé par Clontech. Il permet une expression dans l'albumen des
- 30 semences de maïs.
- la séquence terminatrice de transcription, terminateur polyA NOS, qui correspond à la région en 3' non codante du gène de la nopaline synthase du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* souche à nopaline (Depicker *et al.*, 1982).
- 35 Le plasmide pgzéine-PSLf-Lf où la séquence "PSLf-Lf" est placée sous contrôle du Pgzéine, a été obtenu par clonage aux sites, *SacI* et *BamHI*, traités par l'enzyme T4 DNA polymérase (New England Biolabs), puis déphosphorylés par l'enzyme phosphatase alcaline de veau (Boehringer Mannheim) du plasmide p63, du fragment

EcoRI traité à la Klenow (New England Biolabs) isolé à partir de pBS-12. La ligation a été réalisée comme décrite dans l'exemple 7. Les bactéries, *Escherichia coli* DH5 α rendues préalablement compétentes, ont été transformées (Hanahan, 1983). L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur 50 μ g/ml ampicilline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction. Le clone résultant a été appelé **pgzéine-PSLf-Lf**.

EXEMPLE 10 : Construction de **pgzéine-PSSp-Lf**

10

La construction **pgzéine-PSSp-Lf** est similaire à **pgzéine-PSLf-Lf** excepté que la séquence codant "PSLf-Lf" a été remplacée par celle codant "PSSp-Lf" correspondant au fragment EcoRI traité par l'enzyme Klenow (New England Biolabs), isolé à partir de pBS-14. Le plasmide résultant est appelé **pgzéine-PSSp-Lf**.

15

EXEMPLE 11 : OBTENTION DE PLANTS DE SOLANACEES TRANSGENIQUES.

A. Transformation des plantes de tabac.

20

Les plants de tabac utilisées pour les expériences de transformation (*Nicotiana tabacum* var. *Xanthi* NC) sont cultivées *in vitro* sur le milieu de base de Murashige et Skoog (1962) additionné des vitamines de Gamborg *et al.* (1968, Sigma référence M0404) de saccharose à 20 g/l et d'agar (Merck) à 8 g/l. Le pH du milieu est ajusté à 5,8 avec une solution de potasse avant autoclave à 120°C pendant 20 min. Les plantules de tabac sont repiquées par bouture des entre-nœuds tous les 30 jours sur ce milieu de multiplication MS20 (M0404 à 4,4 g/l, saccharose à 20 g/l, agar agar à 8 g/l, pH5,7).

25

Toutes les cultures *in vitro* sont réalisées en enceinte climatisée, dans les conditions définies ci-dessous:

30

- intensité lumineuse de 30 μ E.m⁻².S⁻¹, photopériode de 16h;
- thermopériode de 26°C le jour, 24°C la nuit.

La technique de transformation utilisée est dérivée de celle de Horsch *et al.* (1985).

35

Une préculture d'*Agrobacterium tumefaciens* souche LBA4404 contenant les plasmides binaires est réalisée durant 48h à 28°C sous agitation, dans du milieu LB additionné des antibiotiques adéquats (rifampicine et tétracycline). La préculture est ensuite diluée au 50ème dans le même milieu et cultivée dans les mêmes conditions. Après une nuit, la culture est centrifugée (10 min., 3000 g), les bactéries sont reprises

dans un volume équivalent de milieu MS30 liquide (M0404 à 4,4 g/l, saccharose à 30 g/l, pH5,7) et cette suspension est diluée au 10ème.

Des explants d'environ 1 cm² sont découpés à partir des feuilles des plantules décrites ci-dessus. Ils sont ensuite mis au contact de la suspension bactérienne pendant 1 h, puis séchés rapidement sur papier filtre et placés sur un milieu de coculture (MS30 solide correspond à MS30 liquide additionné d'agar agar à 8 g/l, de BAP 1 mg/l et d'ANA 0,1 mg/l).

Après 2 jours, les explants sont transférés en boîtes de Pétri sur le milieu de régénération MS30 (correspondant au milieu de coculture supplémenté en kanamycine à 200 mg/l et augmentin à 400 mg/l). Ce milieu contient un agent sélectif, la kanamycine (200 mg/l), un bactériostatique, l'augmentin (400 mg/l) et les hormones nécessaires à l'induction de bourgeons (BAP, 1 mg/l et ANA, 0,1 mg/l). Un repiquage des explants est effectué sur le même milieu après 2 semaines de culture. Après 2 semaines supplémentaires, les bourgeons sont repiqués en boîtes de Pétri sur le milieu de développement composé du milieu MS20 additionné de kanamycine et d'augmentin. Après 15 jours, les bourgeons sont repiqués de moitié. L'enracinement prend environ 20 jours, au terme desquels les plantules peuvent être clonées par bouture d'entre-nœuds ou sorties en serre.

20 **B. Obtention de plantes de tomate transgéniques.**

Les graines de tomate cv. UC82B sont stérilisées au Domestos 10% 15 min. et rincées 3 fois dans de l'eau stérile. Le dernier rinçage est effectué pendant 10 min. sous agitation.

Les graines ainsi stérilisées sont mises à germer sur milieu MSSV/2 (milieu de base de Murashige et Skoog (1962, Sigma référence M6899)/2 additionné des vitamines de Nitsch (Thomas et Pratt, 1981), de saccharose à 30 g/l, d'agar (Merck) à 8 g/l, pH5,9, pendant 7 ou 8 jours en chambre climatisée (intensité lumineuse de 30 $\mu\text{E.m}^{-2}, \text{s}^{-1}$, photopériode de 16 h/8 h, 26°C).

La technique de transformation utilisée est dérivée de celle de Fillatti *et al.* (1987).

Une préculture d'*Agrobacterium tumefaciens* souche LBA4404 contenant les plasmides binaires est réalisée pendant 24 h à 28°C sous agitation dans du milieu LB additionné des antibiotiques adéquats (rifampicine et tétracycline). La préculture est ensuite diluée au 50ème dans le même milieu et cultivée dans les mêmes conditions pendant une nuit. La DO à 600 nm est mesurée, les agrobactéries sont centrifugées (10 min, 3000 g) et repris dans du milieu KCMS liquide (décrit dans la publication de Fillatti *et al.*, 1987) de manière à obtenir une DO à 600 nm de 0,8.

Des améliorations techniques ont été apportées à certaines étapes du protocole de Fillatti *et al.* (1987).

La préculture des explants et la coculture sont réalisées comme décrit par Fillatti *et al.* (1987) excepté que le milieu KCMS est supplémenté en acétosyringone (200 mM).

- Le milieu de lavage 2Z diffère par l'addition de céfotaxime à 500 mg/l au lieu de carbénicilline. Le milieu de développement utilisé est composé du milieu de base de Murashige et Skoog (Sigma MS6899) additionné des vitamines de Nitsch, de saccharose à 20 g/l, de kanamycine à 50 mg/l, d'augmentin à 200 mg/l, d'ANA à 1 mg/l et de zéatine à 0,5 mg/l.

EXEMPLE 12 : OBTENTION DE PLANTS DE COLZA TRANSGENIQUES.

- Les graines de colza de printemps (*Brassica napus* cv WESTAR ou lignées Limagrain) sont désinfectées pendant 40 minutes dans une solution de Domestos à 15%. Après 4 rinçages à l'eau stérile, les graines sont mises à germer, à raison de 20 graines par pot de 7 cm de diamètre et 10 cm de haut, sur du milieu minéral de Murashige et Skoog (Sigma M 5519) avec 30g/l de saccharose et solidifié avec de l'agargel à 5g/l. Ces pots sont placés dans une chambre de culture à 26°C avec une photopériode de 16h/8h et sous une intensité lumineuse de l'ordre de 80 $\mu\text{E m}^{-2} \text{S}^{-1}$.

- Après 5 jours de germination, les cotylédons sont prélevés stérilement en coupant chaque pétiole environ 1 mm au-dessus du noeud cotylédonaire.

- Parallèlement une préculture d'*Agrobacterium tumefaciens* souche LBA4404, contenant le plasmide binaire, est réalisée en erlenmeyer de 50 ml, pendant 36 h à 28°C dans 10 ml de milieu bactérien 2YT complémenté avec les antibiotiques utiles à la sélection de la souche utilisée.

- Cette préculture sert à ensemercer à 1% une nouvelle culture bactérienne effectuée dans les mêmes conditions. Au bout de 14 h la culture est centrifugée 15 min à 3000 g et les bactéries sont reprises dans un volume équivalent de milieu de germination liquide. Cette suspension est distribuée dans des boîtes de pétri de 5 cm de diamètre à raison de 5 ml/boîte.

- L'extrémité sectionnée du pétiole est immergée quelques secondes dans la solution d'agrobactéries ainsi préparées, puis le pétiole est enfoncé de quelques millimètres dans le milieu de régénération. Ce milieu a la même composition de base que le milieu de germination avec en plus 4 mg/l de benzyl-amino-purine (BAP), phytohormone favorisant la néoformation de bourgeons. Dix explants (cotylédon avec pétiole) sont mis en culture par boîte de pétri de 9 cm de diamètre (Greiner référence 664102).

- Après 2 jours de coculture dans les mêmes conditions environnementales que les germinations, les explants sont repiqués dans des boîtes phytatray (Sigma, référence P1552) contenant le milieu précédent complémenté avec un agent sélectif: 45 mg/l de sulfate de kanamycine (Sigma, référence K4000) et un bactériostatique: mélange de 1/6

(en poids) de sel de potassium d'acide clavulanique et de 5/6 sel de sodium d'amoxicilline (Augmentin injectable) à raison de 600 mg/l.

Deux fois de suite, à 3 semaines d'intervalle, les explants sont repiqués stérilement sur du milieu neuf dans les mêmes conditions.

- 5 Les bourgeons verts apparus à la fin du deuxième ou du troisième repiquage sont séparés de l'explant et mis en culture individuellement dans des pots transparents de 5 cm de diamètre et de 10 cm de haut contenant un milieu identique au précédent mais dépourvu de BAP. Après 3 semaines de culture la tige du bourgeon transformé est sectionnée et le bourgeon est repiqué dans un pot de milieu frais. Au bout de trois à
- 10 quatre semaines les racines sont assez développées pour permettre l'acclimatation de la plantule dans un phytotron. Les bourgeons qui ne sont pas verts ou enracinés sont éliminés. Ces plantules sont alors transplantées dans des godets de 7 cm de côté remplis de terreau (norme NF U44551: 40% tourbe brune, 30% bruyère tamisée et 30% sable) saturé en eau. Après deux semaines d'acclimatation en phytotron (température 21°C,
- 15 photopériode 16h/8h et 84% d'humidité relative), les plantules sont repotées dans des pots de 12 cm de diamètre remplis du même terreau enrichi en engrais retard (Osmocote, à raison de 4 g/l de terreau) puis transportées en serre (classe S2) régulée à 18°C, avec deux arrosages quotidien de 2 minutes à l'eau.

- Dès l'apparition de fleurs celles-ci sont ensachées (Crispac, référence SM 570y 300
- 20 mm*700 mm) de façon à empêcher la fécondation croisée.

- Lorsque les siliques sont arrivées à maturité, elles sont récoltées, séchées, puis battues. Les graines obtenues servent au dosage de l'activité biochimique. La sélection de la descendance transgénique se fait par germination sur un milieu contenant du sulfate de kanamycine à raison de 100 à 150 mg/l (selon les génotypes). Les conditions opératoires
- 25 sont identiques à celles décrites ci-dessus à ceci près que les germinations sont effectuées en tubes de verre avec une seule graine par tube. Seules les plantules développant des racines secondaires les trois premières semaines sont acclimatées en phytotron avant d'être passées en serre.

30

EXEMPLE 13 : OBTENTION DE PLANTES DE MAÏS TRANSGENIQUES.

A. Obtention et utilisation de cal de maïs comme cible pour la transformation génétique.

- 35 La transformation génétique du maïs, quelle que soit la méthode employée (électroporation; *Agrobacterium*, microfibres, canon à particules), requiert généralement l'utilisation de cellules indifférenciées en divisions rapides ayant conservé une aptitude à la régénération de plantes entières. Ce type de cellules compose le cal friable embryogène (dit de type II) de maïs.

Ces cals sont obtenus à partir d'embryons immatures de génotype HI II ou (A188 x B73) selon la méthode et sur les milieux décrits par Armstrong (1994). Les cals ainsi obtenus sont multipliés et maintenus par repiquages successifs tous les quinze jours sur le milieu d'initiation.

- 5 Des plantules sont ensuite régénérées à partir de ces cals en modifiant l'équilibre hormonal et osmotique des cellules selon la méthode décrite par Vain et al. (1989). Ces plantes sont ensuite acclimatées en serre où elles peuvent être croisées ou autofécondées.

10 **B. Utilisation du canon à particules pour la transformation génétique du maïs.**

- Le paragraphe précédent décrit l'obtention et la régénération des lignées cellulaires nécessaires à la transformation ; on décrit ici une méthode de transformation génétique conduisant à l'intégration stable des gènes modifiés dans le génome de la plante. Cette
- 15 méthode repose sur l'utilisation d'un canon à particules identique à celui décrit par J. Finer (1992) ; les cellules cibles sont des fragments de cals décrits dans le paragraphe 1. Ces fragments d'une surface de 10 à 20 mm² ont été disposés, 4 h avant bombardement, à raison de 16 fragments par boîte au centre d'une boîte de petri contenant un milieu de culture identique au milieu d'initiation, additionné de 0,2 M de mannitol + 0,2 M de
- 20 sorbitol. Les plasmides portant les gènes à introduire sont purifiés sur colonne Qiagen,, en suivant les instructions du fabricant. Ils sont ensuite précipités sur des particules de tungsten (M10) en suivant le protocole décrit par Klein (1987). Les particules ainsi enrobées sont projetées vers les cellules cibles à l'aide du canon et selon le protocole décrit par J. Finer (1992).

- 25 Les boîtes de cals ainsi bombardées sont ensuite scellées à l'aide de Scellofrais, puis cultivées à l'obscurité à 27°C. Le premier repiquage a lieu 24 h après, puis tous les quinze jours pendant 3 mois sur milieu identique au milieu d'initiation additionné d'un agent sélectif dont la nature et la concentration peuvent varier selon le gène utilisé (voir paragraphe 3). Les agents sélectifs utilisables consistent généralement en composés
- 30 actifs de certains herbicides (Basta TM, Round upTM,) ou certains antibiotiques (Hygromycine, Kanamycine...).

- On obtient après 3 mois ou parfois plus tôt, des cals dont la croissance n'est pas inhibée par l'agent sélection, habituellement et majoritairement composés de cellules résultant de la division d'une cellule ayant intégré dans son patrimoine génétique une ou plusieurs
- 35 copies du gène de sélection. La fréquence d'obtention de tels cals est d'environ 0,8 cal par boîte bombardée.

Ces cals sont identifiés, individualisés, amplifiés puis cultivés de façon à régénérer des plantules (cf. paragraphe A exemple 13). Afin d'éviter toute interférence avec des

cellules non transformées toutes ces opérations sont menées sur des milieux de culture contenant l'agent sélectif.

Les plantes ainsi régénérées sont acclimatées puis cultivées en serre où elles peuvent être croisées ou autofécondées.

- 5 Les plantes obtenues selon l'invention possèdent un phénotype distant de celui obtenu dans WO9637094.

EXEMPLE 14 : Détection des lactoferrines humaines recombinantes (rhLf).

- Afin de tester les plantes les plus productives, une extraction des protéines solubles a été réalisée sur une vingtaine d'événements de transformation pour chacune des constructions pBIOC21-PSLf-Lf et pBIOC21-PSSp-Lf, suivie d'une mise en évidence qualitative et quantitative de la Lf recombinante (rhLf). Ainsi, les feuilles ont été broyées dans l'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Les protéines solubles ont été extraites à partir de la matière végétale par un tampon d'extraction (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, Triton X 100 0.1 %, pH6,5), à raison de 4 ml de tampon par gramme de feuille. Après centrifugation de l'extrait pendant 30 min à 13 000 g, le surnageant a été décanté, filtré et utilisé pour les étapes ultérieures de mise en évidence de la lactoferrine recombinante.
- 10
- 15

Méthode ELISA de détection de la Lactoferrine (Mikogami et al, 1994).

20

- La sélection d'un transformant pour chaque type de construction moléculaire se fait en comparant la quantité de Lf recombinante à la quantité de protéines solubles. Le dosage des protéines solubles a été réalisé par microtitration (Promega, Charbonnière, France), et le taux d'expression de rhLf a été mesuré par technique ELISA décrite ci-dessous.
- 25

- Un anticorps polyclonal de lapin anti-lactoferrine humaine a été produit comme suit : L'immunisation du lapin a été réalisée par 3 injections intra-musculaires successives de hLf. Lors de la première injection, 1 mg de hLf dissoute dans 0,25 ml de sérum physiologique apyrogène et 0,25 ml d'adjuvant complet de Freund (Difco) ont été injectés. Après 2 semaines, une seconde injection a été réalisée avec 1 mg de hLf dissoute dans 0,25 ml de sérum physiologique apyrogène et 0,25 ml d'adjuvant incomplet de Freund (Difco). Puis, au bout de 4 semaines, une troisième injection a été réalisée dans les mêmes conditions que la seconde. Un premier prélèvement sanguin effectué 10 à 15 jours après la troisième injection a permis d'obtenir 20 ml de sang. Puis, des injections correspondant à des rappels d'immunisation (même condition que la
- 30
- 35

seconde injection décrite ci-dessus) ont permis des prélèvements répétés tous les 10 jours. Les immunoglobulines de l'antisérum de lapin ont été purifiées par précipitation au sulfate d'ammonium à 35% de saturation. Le précipité a été dialysé dans un tampon Tris-HCl 10 mM pH8, puis purifiés par chromatographie sur DEAE Trisacryl (IBF).

- 5 Les anticorps polyclonaux ont été incubés dans les puits de la plaque de microtitration à raison de 100 µl par puits (soit 35 µg /ml) dans un tampon bicarbonate de sodium (NaHCO₃) 10 mM (pH 9,6) une nuit à 4°C ou 2h à 37 °C.

- 10 Une incubation de la plaque ELISA (Falcon) dans 150 µl de PBS (NaCl 150 mM, phosphate de sodium (Na₂HPO₄, NaH₂PO₄) 50 mM, pH7,5) - tween 2% pendant 20 min à température ambiante a permis de bloquer les sites non spécifiques. Après trois lavages au PBS - tween 0,05%, 100 µl de chaque échantillon issus des extraits de protéines solubles ont été incubés à 37 °C pendant 2h avant que la rhLf ne soit détectée par des Ac monoclonaux anti-Lf. Les Ac monoclonaux anti-Lf ont été produits par fusion de splénocytes de souris et de cellules de myélome SP₂O/Ag. Le surnageant du milieu de culture de ces hybridomes a été utilisé directement lors du test ELISA. Le complexe Ac-rhLf a été reconnu par des anticorps de chèvre anti-souris marqués à la peroxydase (Diagnostic Pasteur) dilué au 1/3000^e dans du PBS et a été mis en contact, comme précédemment, 2h à 37 °C. La révélation est réalisée sous agitation par addition de la solution de substrat (4 mg d'ortho-phenylénédiamine dihydrochloride dans 10 ml de tampon "acide citrique / citrate de sodium" 0,2M pH 5,5 en présence de 10 µl d'H₂O₂), la coloration a été obtenue en quelques minutes, et la réaction a été stoppée par ajout de 50 µl par puits de H₂SO₄ à 20 %. La densité optique a été lue à 490 mM.
- 15
- 20

Entre chaque étape, les puits ont été lavés au PBS-tween 0,05 %.

- 25 Le rapport rhLf sur protéines solubles est représenté dans le diagramme Fig. 1. Il a permis de sélectionner le transformant T19 pour la construction pBIOC21-PSLf-Lf, et le transformant T30 pour la construction pBIOC21-PSSp-Lf.

30 *Technique de Western Blot.*

Afin de vérifier la masse moléculaire apparente de la rhLf des transformants sélectionnés, des tests de Western Blot (Fig. 2 et 3), et d'immunoprécipitation (Fig. 4) ont été effectués à partir des extraits de protéines solubles.

35

Après électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS-PAGE 7,5 % (20µg de protéines solubles par puits), les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose. Celle-ci est alors incubée dans du *PBS-tween 2 % puis lavée 3 fois dans du PBS-tween 0,05 %. Des anticorps polyclonaux de lapin ont été produits par purification d'un anti-serum de lapin par chromatographie sur DEAE Trisacryl. Après dilution au 500e dans du PBS (soit 7 µg/ml), ils ont été mis en contact avec la membrane durant 3h à 20 °C avant que celle-ci ne soit lavée dans du PBS-tween 0,05 %. Le conjugué, un anticorps de chèvre anti-IgG de lapin (Diagnostic-Pasteur) marqué à la peroxydase et dilué au 2500^e dans du PBS a ensuite été incubé 1h à 20 °C. La membrane a été à nouveau lavée trois fois avec du PBS. Une dernière incubation de la membrane dans 100 ml de PBS en présence de 40 mg de DAB (3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) et de 200 µl d'H₂O₂ a permis la révélation finale.

*PBS : 150 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, pH7,5.

Comme le montre la Fig. 2, l'analyse des plantes issues de la première transformation montre la présence d'une bande de masse moléculaire apparente de 80 kDa reconnue par les anticorps anti-Lf. Aucun signal n'est détecté chez le témoin non transformé à savoir *Nicotiana tabacum* var. Xanthi. La présence de rhLf1 a été mise en évidence dans le transformant T19, ce qui confirme les résultats obtenus par l'analyse ELISA.

La Fig. 3 représente un Western-blot des protéines solubles issues du transformant T30. Elle démontre l'existence de rhLf de masse moléculaire apparente de 80 kDa qui co-migre avec la Lf isolée à partir du lait humain. Il est à noter que la rhLf se présente sous la forme d'une bande doublée. Ce doublet ne s'explique pas par une modification au niveau de la séquence N-terminale (cf. exemple 16).

Immunoprécipitation

6 mg de Protéine-A Sepharose (Pharmacia) ont été incubés 1 h à température ambiante en présence de 5 mg d'anticorps polyclonaux de lapin anti-Lf humaine. Ces anticorps ont été produits comme décrit dans l'exemple 14. Les billes de Protéine-A Sepharose ont été récupérées par centrifugation, lavées trois fois par du TBS (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH8,2) et mises en agitation dans 20 ml d'extrait de protéines solubles, 2 h à température ambiante. Après trois lavages au TBS, le complexe protéique a été dissocié dans du tampon de reprise (Tris 62,5 mM, SDS 2%, saccharose 10%, β-mercaptoéthanol 5%, bleu de bromophénol 5%) séparé par gel de polyacrylamide SDS-PAGE 7,5% et enfin coloré au bleu de Coomassie.

La Fig. 4 montre qu'après immunoprécipitation des extraits de protéines solubles du transformant T19, la rhLf est visualisée sous forme d'un doublet de masse moléculaire apparente de 80 kDa. Concernant le transformant T30, le résultat est identique.

5

EXEMPLE 15 : Purification de la lactoferrine humaine recombinante (rhLf).

10 Une chromatographie d'affinité sur gel de Sepharose 4B activé au BrCN (Pharmacia Biotech) sur lequel a été branché un anticorps polyclonal anti-lactoferrine humaine a permis la purification de rhLf1 issue de pBIOC21-PSLf-Lf et de rhLf2 issue de pBIOC21-PSSp-Lf :

1 ml de gel fixant environ 3 mg d'anticorps, a été incubé pendant une nuit à 4°C en "batch" dans 100 ml d'extrait protéique dont le pH est amené à 8,2 par du Tris 1 M.

15 Puis, le gel a été lavé abondamment par du TBS pH 8,2 (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH8,2) suivi de TBS en 1 M NaCl, pH 8,2. L'élution a été réalisée par un tampon glycine-HCl 0,2 M, pH 2,4, en trois éluions successives qui sont analysées sur gel de polyacrylamide 7,5 %.

20 Cette technique a été utilisée pour la préparation de rhLf1 en vue de l'analyse de la séquence N-terminale. L'analyse en gel de polyacrylamide SDS-PAGE 7,5% des rhLf1 et rhLf2 purifiées par cette technique ne montre pas de différence de masse moléculaire entre les deux rhLf.(Fig. 5)

25 En ce qui concerne la protéine chimérique rhLf2 issue de pBIOC21-PSSp-Lf, une purification à plus grande échelle a été entreprise en vue d'analyses approfondies de cette protéine. En effet, par chromatographie d'échange d'ions sur colonne SP Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech) équilibrée dans un tampon acétate de Na 0,2 M pH 7, sur un appareil de type Biopilot (Pharmacia biotech), la rhLf 2 a été éluee par un gradient de NaCl de 0 à 1 M. La rhLf2 a été retrouvée majoritairement dans une fraction éluee à 0,7 M NaCl comme le prouvent les tests ELISA réalisés sur l'ensemble des fractions collectées.

35 Les fractions positives ont été concentrées par ultrafiltration sur Centriprep 30 (Amicon, Beverly, USA), dialysées contre du PBS (NaCl 50 mM, Na2HPO4-NaH2PO4 50 mM, pH7,5) et congelées à - 20 °C. La pureté de la rhLf2 a été vérifiée en gel de polyacrylamide SDS - PAGE 7,5 %.

EXEMPLE 16 : Analyse de la séquence N-terminale.

Une analyse de la séquence N-terminale par le procédé de dégradation d'Edman a
5 montré que pour chacune des deux constructions, c'est-à-dire pour les protéines rhLf1 et
rhLf2, la séquence des 7 premiers résidus est "GRRRRSV", ce qui correspond à la
séquence exacte de l'extrémité N-terminale de la lactoferrine humaine mature de
référence. Ces résultats montrent que la fusion du peptide signal de sécrétion de la
sporamine de patate douce ou de celui de la lactoferrine humaine à la séquence codant la
10 lactoferrine humaine mature permet un clivage correct de ce peptide signal.

EXEMPLE 17 : Analyse en spectrométrie de masse MALDI / TOF.

Les analyses ont été réalisées sur un spectromètre de masse MALDI Vision 2000 à
15 désorption laser (Finnigan MAT, Bremen, Allemagne). 3 µl de solution contenant 100
pmoles de lactoferrine ont été ajoutés à 17 µl de solution matrice contenant 10 mg/ml
d'acide 2,5 dihydroxy-benzoïque dans un mélange eau/acétonitrile (30/70). 1 µl de ce
produit a été envoyé sur la cible, simultanément à un calibre de masse (Sérotransferrine
humaine, Sigma, de masse moléculaire 79590Da dans de l'acide sinapinique). La masse
20 moléculaire de rhLf2 est de 81250 Da, ce qui correspond à la masse calculée de la chaîne
polypeptidique de la hLf (76320 Da) sur laquelle est branchée 2 glycannes de 5180 Da
de masse moléculaire totale. A partir de ces valeurs, le taux de glycannes représente 6,35
% de la masse totale de la glycoprotéine.

25 EXEMPLE 18 : Composition des glycannes de rhLf2.

L'analyse des monosaccharides de la glycoprotéine a été réalisée par
chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire OV 101 et par
chromatographie sur Girdel 300. Le flux d'hélium est de 10 ml/min et la pression de 0.5
Bars. La température est programmée de 120°C à 240°C à 2°C/min. Les dérivés
30 triméthylsilylés sont préparés par méthanolyse (Zanetta *et al.*, 1972), par N ré-
acétylation et triméthylsilylation (Kamerling *et al.*, 1975). L'analyse montre un taux de
6,5 % d'oses totaux dans la glycoprotéine. La composition molaire est décrite ci-dessous
:

| | Fucose | Galactose | Mannose | N-acétyl-glucosamine | Xylose | Acide N-acétyl neuraminique |
|-------|--------|-----------|---------|----------------------|--------|-----------------------------|
| rhLf2 | 1,5 | 0,7 | 3,0 | 3,3 | 0,7 | 0,0 |
| Lfh | 1,3 | 2,1 | 3,0 | 4,0 | 0,0 | 1,8 |

Les résultats obtenus suggèrent une structure de type N-acétyl-lactosaminique des glycanes de rhLf2 avec une certaine hétérogénéité de la composition molaire en monosaccharides. Il est à noter principalement la présence de xylose, la faible présence de galactose, et l'absence d'acide N-acétyl neuraminique .

EXEMPLE 19 : Expériences de fixations aux cellules Jurkat.

De nombreux travaux réalisés sur les lymphocytes ont permis de mettre en évidence la présence de récepteurs spécifiques de la lactoferrine à leur surface. L'apparition à la surface des lymphocytes a été étudiée par le biais d'un agent mitogène, la phytohémagglutinine (PHA, Mazurier *et al.*, 1989). Ces travaux ont montré que les lymphocytes quiescents ne possèdent pas de récepteur pour la lactoferrine et que la phytohémagglutinine induit l'apparition de récepteurs de haute affinité à la surface des lymphocytes circulants, récepteurs qui sont synthétisés au cours des deux premiers jours d'activation. Les constantes de fixation et le nombre de sites de fixation sont respectivement de 80 nM et 200000 nM lors des conditions d'activation à la PHA. Ce même récepteur a été étudié récemment pour la lignée lymphoblastique Jurkat qui permet d'obtenir des résultats stables et reproductibles (Bi *et al.*, 1994). Dans l'étude de fixation de la rhLf2, cette lignée cellulaire Jurkat a été utilisée comme test d'activité biologique de la protéine recombinante.

Les cellules lymphoblastiques T de la lignée Jurkat sont cultivées en milieu RPMI 1640 (GIBCO, Cergy Pontoise, France) pH 7,4 contenant 25 mM d'Hepes, 2 mM de L glutamine, de gentamycine (5 mg / ml) en présence de 10 % de serum de veau foetal préalablement inactivé par la chaleur, dans une étuve à 5 % de CO₂, à 37 °C.

Au stade de subconfluence, les cellules sont diluées à une densité de 4.10^5 / ml pour les expériences de fixation.

Une quantité de 100 µg de rhLf2 a été marquée par 0,2 m Ci d'¹²⁵I, en utilisant les iodo-beads (Pierce, Rockford, USA) selon les recommandations du fournisseur. L'iode libre est éliminée par gel filtration sur colonne Sephadex G-25 équilibrée dans du PBS (50mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄-NaH₂PO₄, pH 7,5). Les expériences de fixation ont été effectuées dans du RPMI contenant 0,4 % (w/v) de transferrine humaine afin d'éviter les fixations non-spécifiques de la rhLf 2 sur les cellules ou sur le plastique. Des

aliquotes de 100 µl contenant $5 \cdot 10^5$ cellules ont été réparties dans des tubes en propylène de 1,5 ml en présence de rhLf2 marquée à des concentrations croissantes de 0 à 100 nM.

La fixation non spécifique a été évaluée en présence de 100 excès molaire de Lf non marquée. Les cellules ont été incubées avec les protéines pendant 1 h à 4 °C en présence de 0,01 % (w/v) d'azide de sodium. Enfin, les cellules ont été lavées 3 fois par 1 ml de RPMI et le culot a été finalement repris dans 0,5 ml de PBS. La radioactivité a alors été mesurée par un compteur de radiations gamma Compugamma, LKB - Wallac (Turku, Finland).

La fixation de rhLf2 marquée à l' ^{125}I sur les cellules lymphoblastiques T Jurkat a été analysée par la méthode de Scatchard (1949). Comme le montre la Fig. 6, les courbes de fixation de rhLf2 et de la Lfh isolée à partir du lait sont similaires. Dans la gamme de Lfs utilisées, une seule classe de récepteurs est détectée à la surface des cellules avec une constante de dissociation de $80,27 \pm 33$ nM et un nombre de sites par cellules de 124400 ± 36000 . Sur les mêmes cellules, la hLf se fixe avec une constante de dissociation de $89,7 \pm 22$ nM et un nombre de sites par cellules de 103300 ± 14000 .

Ainsi, le test de fixation montre que rhLf2 possède une conformation très proche de celle de la Lf du lait humain puisqu'elle est reconnue avec les mêmes paramètres sur son récepteur lymphocytaire.

20

EXEMPLE 20 : Fixation de rhLf2 à la surface des cellules HT29

La fixation de la lactoferrine du lait humain a été démontrée sur une lignée entérocytaire (HT-29) dérivée d'un adénocarcinome humain colique capable de se différencier en entérocytes (Mikogami *et al.*, 1994, 1995). Cet auteur a montré que la fixation de la lactoferrine sur son récepteur entérocytaire n'est pas liée à son degré de saturation en fer et est spécifique c'est à dire qu'elle ne résulte pas d'interactions électrostatiques ou lectiniques.

Sur les cellules de type HT29, le nombre de sites est de l'ordre de $3 \cdot 10^6$ par cellule et le Kd d'environ 10^{-6} M. Le clone HT-29-18C1 répond à ces caractéristiques et a été utilisé pour la fixation de rhLf2 afin de vérifier son activité biologique.

Les cellules HT29 du clone 18C1 ont été cultivées en DMEM (Eurobio, Les Ullis, France) contenant 2 mM de L-glutamine et de la gentamycine (5 mg/l) en présence de 10% de serum de veau foetal préalablement inactivé par la chaleur dans une étuve à 10% de CO₂ à 37°C. A ce stade de subconfluence, les cellules ont été fractionnées et remises en culture en puits de 2 cm², à raison de $2 \cdot 10^4$ cellules/cm². Après 21 jours de

culture qui permettent la différenciation en entérocytes, ces cellules ont été utilisées pour les études de fixation.

5 La rhLf2 a été marquée à l' ^{125}I comme décrit dans l'exemple 19. Les cellules de chaque puits ont été incubées 1 heure sur glace en présence de 0,01% (p/v) d'azide de sodium et de transferrine humaine qui évite les fixations non spécifiques de la lactoferrine. La radioactivité d'une fraction de 50 μl a été mesurée pour le calcul de la concentration du ligand libre présenté aux cellules. Après 5 rinçages de 500 μl de DPBS+ (Sigma, réf. D1283), les cellules sont décollées par 200 μl de DPBS+/EDTA (5 g/l) et la radioactivité de la rhLf2 fixée est mesurée par compteur de radiations γ
10 Compugamma, LKB-Wallac.

La fixation de rhLf2 marquée à l' ^{125}I sur les cellules entérocytaires HT-29-18C1 est analysée par la méthode de Scatchard. Comme le montre la Fig. 7, les courbes de fixation des rhLf2 et Lf isolée à partir du lait sont similaires. dans la gamme des
15 lactoferrines utilisées, une seule classe de récepteurs est détectée à la surface des cellules avec une constante de dissociation de $0,8 \pm 0,19 \mu\text{M}$ et un nombre de sites par cellules de $1,8 \times 10^6 \pm 0,28 \times 10^6$. Sur les mêmes cellules, la lactoferrine humaine se fixe avec une constante de dissociation de $1 \pm 0,2 \mu\text{M}$ et un nombre de sites par cellules de $4 \times 10^6 \pm 0,5 \times 10^6$.

20 Cette fixation sur les cellules entérocytaires démontre, comme dans l'exemple 19, que rhLf2 est reconnue par le récepteur spécifique de la lactoferrine de façon identique à la protéine native, ce qui suggère une bonne conformation et une activité biologique comparable à celle de la lactoferrine isolée à partir du lait.

REFERENCES

- Armstrong, Malze Handbook; M. Freeling, V. Walbot Eds.; pp. 665-671 (1994).
- An *et al.*, Plant Physiol, 81, 301-305 (1986).
- 5 An G., Plant Physiol., 81, 86-91 (1986).
- Bi B.Y. *et al.*, Eur. J. Cell Biol., 65,164-171 (1994).
- Depicker *et al.*, J. Mol. Appl. Genet., 1, 561-573 (1982).
- Depigny-This *et al.*, Plant. Mol. Biol., 20, 467-479 (1992).
- Franck *et al.* Cell, 21, 285-294 (1980).
- 10 Fillatti J.J. *et al.* Biotechnologie, 5, 726-730 (1987).
- Finer J., Plant Cell Report, 11, 323-328 (1992).
- Gamborg O.L. *et al.* Exp. Cell. Res., 50, 151-158 (1968).
- Gaubier *et al.*, Mol. Gen. Genet., 238, 409-418 (1993).
- Hanahan D., J. Mol. Biol., 166, 557-580 (1983).
- 15 Holsters *et al.*, Mol. Gen. Genet., 163, 181-187 (1978).
- Horsch R.B. *et al.*, Science, 227, 1229-1231 (1985).
- Kay *et al.*, Science, 236, 1299-1302 (1987).
- Kamerling *et al.*, Biochem. J. 151, 491-495 (1975).
- Klein, Nature, 327, 70-73 (1987).
- 20 Laemmli U.K., Nature, 227, 680-685 (1970).
- Legrand, D. *et al.*, Biochem. J. 236, 839-844 (1986).
- McElroy *et al.*, Mol. Gen. Genet., 231, 150-160 (1991).
- Matsuoka K. et Nakamura K., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 834-838 (1991).
- 25 Mazurier J. *et al.*, Eur. J. Biochem. 179, 481-487 (1989).
- Metz-Boutigue M.H. *et al.*, Eur. J. Biochem. 145, 659-676 (1984).
- Mikogami T. *et al.*, J. Am. Physiol. 267, G308-G315 (1994).
- Mikogami T. *et al.*, Biochem. J. 308, 391-397 (1995).
- Mitra , Plant. Physiol. 106, 977-981 (1994)
- 30 Murakami *et al.*, Plant Mol. Biol., 7, 343-355 (1986).
- Murashige T. et Skoog F., Physiol. Plantarum, 15, 473-497 (1962).
- Ni *et al.*, Plant J., 7, 661-676 (1995).

- Powell, M.J. et Ogden, J.E., Nucl. Acids Res. 18, 4013 (1990).
- Reina *et al.*, Nucleic Acid Research, 18, 6426 (1990).
- Renart J. et Sandoval I.V., Meth. Enzymol., 104, 455-460 (1984).
- Rey, M.W. *et al.*, Nucl. Acids Res. 18, 5288 (1990).
- 5 Scatchard, G., Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660-672 (1949).
- Spik G. *et al.*, Immunology 35, 663-671 (1978).
- Spik G. *et al.*, Eur. J. Biochem. 121, 413-419 (1982).
- Vain *et al.*, Plant Cell Tissue and Organ Culture, 18, 143-151 (1989)
- Van Berkel, P.H.C. *et al.*, Biochem. J. 319, 117-122 (1996).
- 10 Zimecki M. *et al.*, Immunol. Lett. 30, 119-124 (1991).

Description des figures :

Fig. 1 : Taux d'expression de rhLf1 en fonction de la quantité de protéines solubles totale (donnés en %). Colonnes 1 à 19 ; transformants primaires. Colonne NT : tabac non transformé.

Fig. 2 : Détection de rhLf1 par techniques de Western Blot d'un extrait de protéines solubles de transformants primaires. Pistes 1, 2, 18, 19, 20 : transformants primaires. Piste NT : tabac non transformé. La position des témoins de masses moléculaires est indiquée sur la gauche.

Fig. 3 : Détection de rhLf2 par technique de Western Blot d'un extrait concentré de protéines solubles du transformant T30. Piste (1) : analyse du transformant T30. (2) Lf humaine isolée du lait. La position des témoins de masses moléculaires est indiquée sur la gauche.

Fig. 4 : Détection de rhLf1 par immunoprécipitation à partir d'un extrait de protéines solubles du transformant T19. L'analyse en SDS-PAGE met en évidence la rhLf1 et les anticorps anti-Lf (Ac). La position des témoins de masses moléculaires est indiquée sur la gauche.

Fig. 5 : analyse de rhLf1 et rhLf2 après purification par chromatographie d'affinité. Piste (1) : rhLf1, piste (2) : rhLf2. La position des témoins de masses moléculaires est indiquée sur la gauche.

Fig. 6 : Fixations spécifiques de la rhLf2 (▲) et de la hLf du lait (○) sur les cellules lymphoblastiques Jurkat. Les Lf sont marquées à l'¹²⁵I. La fixation non spécifique est mesurée en présence de 100 excès molaire de Lf native non marquée et représente environ 25% de la fixation totale. Elle est ôtée systématiquement de la fixation totale. Ces valeurs sont déterminées par deux expérimentations distinctes, chaque fois réalisées en double.

Fig. 7 : Fixations spécifiques de la rhLf2 (▲) et de la fLf du lait (○) sur les cellules entérocytaires HT29. Les Lf sont marquées à l'¹²⁵I. La fixation non spécifique est mesurée en présence de 100 excès molaire de Lf native non marquée et représente environ 25% de la fixation totale. Elle est ôtée systématiquement de la fixation totale. Ces valeurs sont déterminées par deux expérimentations distinctes, chaque fois réalisées en double.

REVENDICATIONS

- 5 1. Utilisation d'une séquence nucléotidique recombinante contenant, d'une part, un ADNc codant pour une lactoferrine, notamment la lactoferrine humaine, ou les protéines dérivées et d'autre part, les éléments permettant à une cellule végétale de produire la lactoferrine ou les protéines dérivées, codées par ledit ADNc, notamment un promoteur et un terminateur de transcription reconnus par la machinerie transcriptionnelle des cellules végétales, pour la transformation de cellules de plantes en vue de l'obtention, à partir de ces cellules, ou de plantes obtenues à partir de ces dernières, de lactoferrine ou des protéines dérivées.
- 10 2. Une séquence nucléotidique recombinante, caractérisée en ce qu'elle contient d'une part la séquence codante pour la lactoferrine, notamment la lactoferrine humaine, ou les protéines dérivées et d'autre part, les éléments permettant à une cellule végétale de produire la lactoferrine ou les protéines dérivées codées par ladite séquence, notamment un promoteur et un terminateur de transcription reconnus par la machinerie transcriptionnelle des cellules végétales.
- 15 3. Un vecteur, notamment un plasmide, contenant une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 ou 2 insérée le cas échéant en un site non essentiel pour sa réplication.
- 20 4. Un hôte cellulaire, notamment toute bactérie telle que *Agrobacterium tumefaciens*, transformé par un vecteur selon la revendication 3.
- 25 5. Un procédé d'obtention de lactoferrine, notamment la lactoferrine humaine, ou des protéines dérivées, caractérisé en ce qu'il comprend :
- la transformation de cellules végétales, notamment à l'aide d'un hôte cellulaire selon la revendication 4, lui-même transformé par un vecteur selon la revendication 3, de manière à intégrer dans le génome de ces cellules une séquence recombinante selon la revendication 2,
 - 30 - le cas échéant, l'obtention de plantes transformées à partir des cellules transformées susmentionnées,
 - la récupération de la lactoferrine, notamment la lactoferrine humaine, ou des protéines dérivées recombinantes produits dans lesdites cellules ou plantes transformées susmentionnées, notamment par extraction, suivie, le cas échéant, par
 - 35 une purification.
6. Une plante, un extrait de plante ou une partie de plante, notamment feuilles et/ou fruits et/ou semences et/ou cellules de plantes, transformés génétiquement, caractérisée en ce qu'elle contient une (ou plusieurs) séquence(s) nucléotidique(s) recombinante(s) selon la revendication 2, intégrée(s) de façon stable dans leur génome,

ces plantes étant choisies notamment parmi le colza, le tabac, le maïs, le pois, la tomate, la carotte, le blé, l'orge, la pomme de terre, le soja, le tournesol, la laitue, le riz, la luzerne, et la betterave.

5 7. Une lactoferrine, notamment une lactoferrine humaine, ou protéine dérivée caractérisée en ce qu'elle est obtenue selon le procédé de la revendication 5.

8. Une plante, un extrait de plante ou une partie de plantes, notamment feuilles et/ou fruits et/ou semences et/ou cellules de plantes, transformés génétiquement, caractérisés en ce qu'ils contiennent une lactoferrine, notamment la lactoferrine humaine, ou une protéine dérivée selon l'invention, ces plantes étant
10 choisies notamment parmi le colza, le tabac, le maïs, le pois, la tomate, la carotte, le blé, l'orge, la pomme de terre, le soja, le tournesol, la laitue, le riz, la luzerne, et la betterave.

11. Utilisation de plantes, extraits de plantes ou parties de plantes selon la revendication 6 ou 8, et/ou de protéines (lactoferrine, notamment la lactoferrine humaine, ou protéine dérivée) selon la revendication 7, pour l'obtention de compositions pharmaceutiques, médicales, odontologiques, cosmétiques ou biotechnologiques.
15

12 Un Biomatériau et une composition pharmaceutique, médicale, odontologique, cosmétique ou biotechnologique. caractérisée en ce qu'elle comprend des plantes, extraits de plante, parties de plantes plantes selon la revendication 6 ou 8 et/ou
20 de protéines (lactoferrine, notamment la lactoferrine humaine, ou protéine dérivée) selon la revendication 7.

1/7

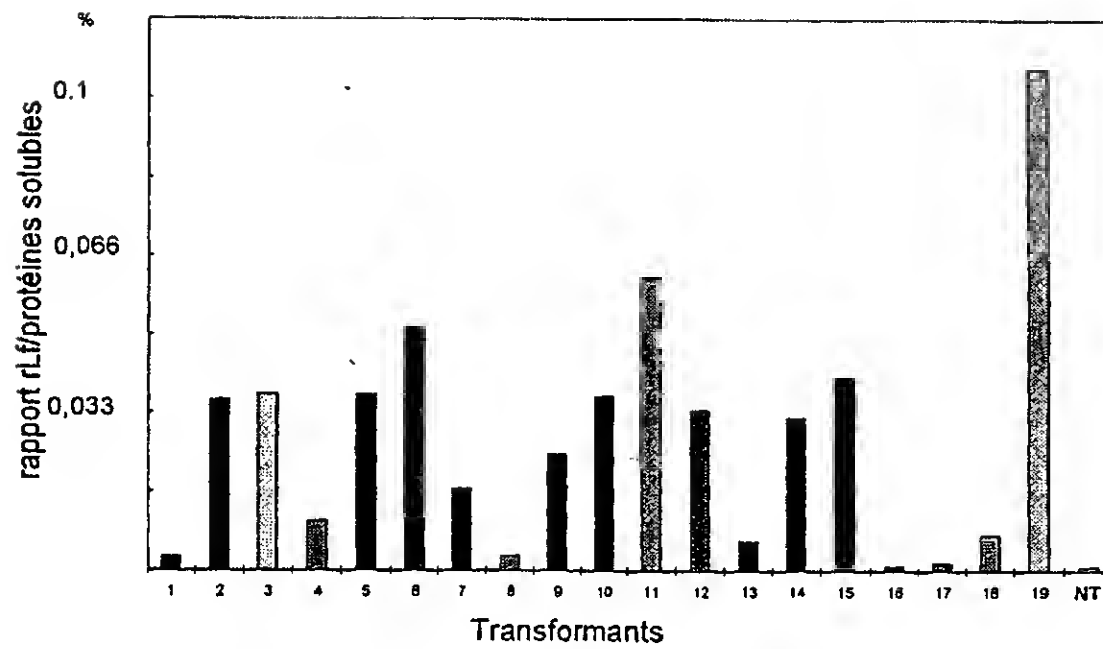


FIG 1

217

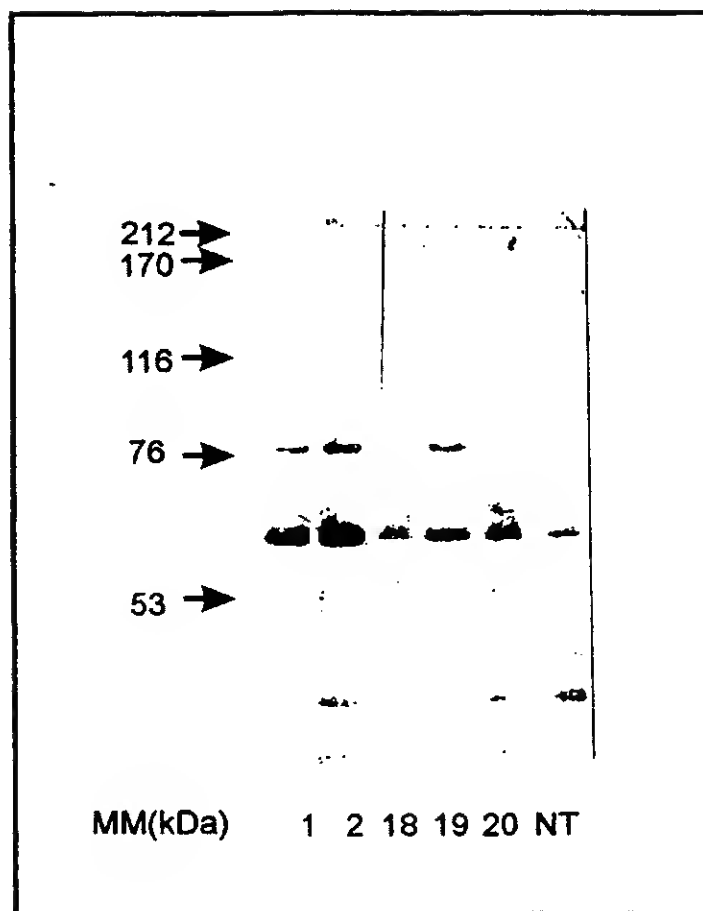


Fig 2

3/7

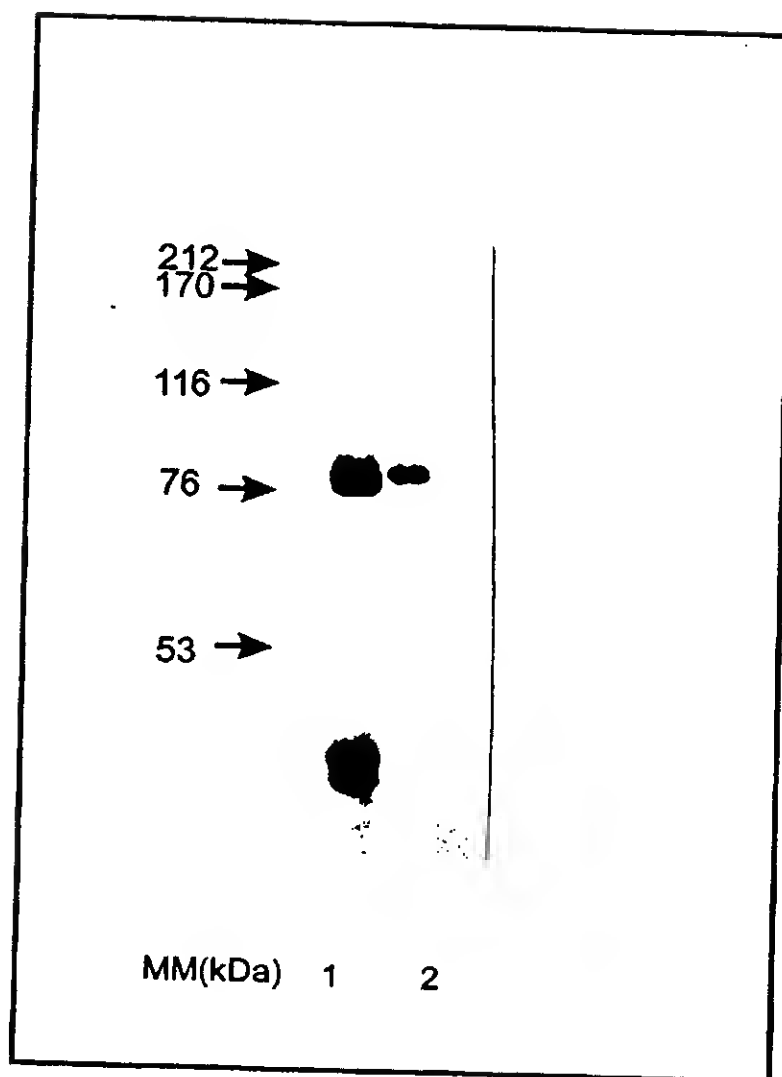


Fig 3.

417

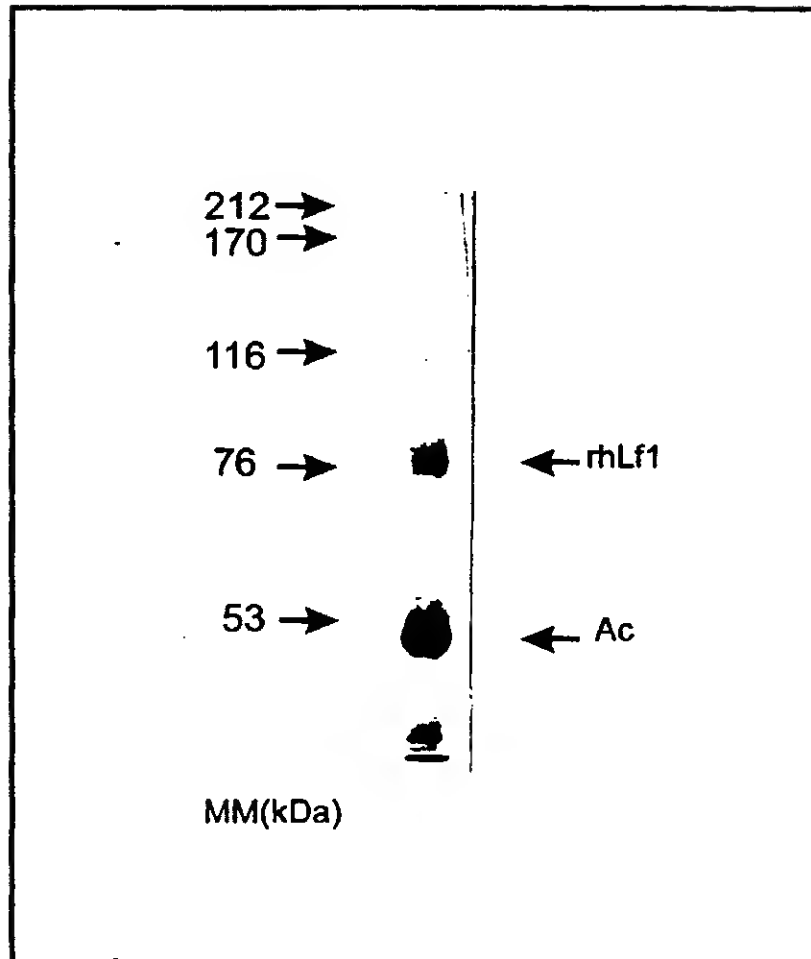


Fig. 4

5/7

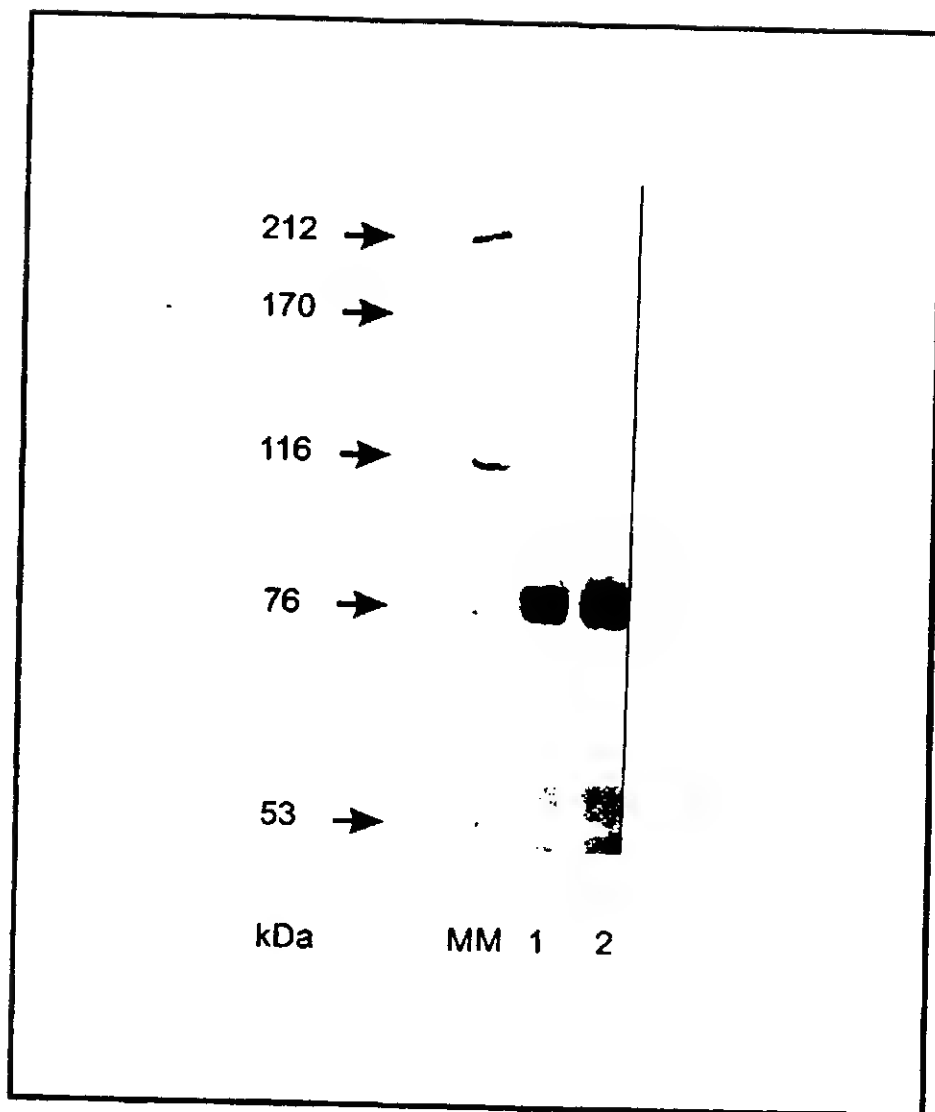


Fig. 5

617

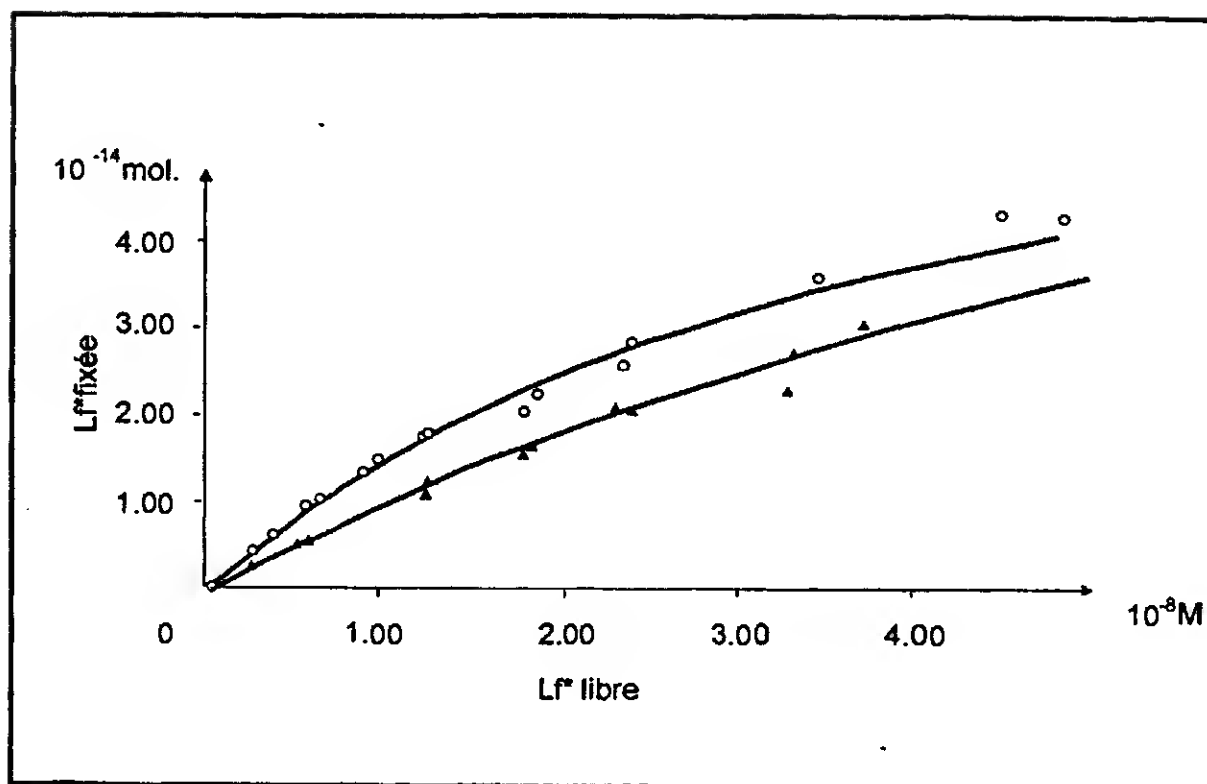


Fig. 6

7/7

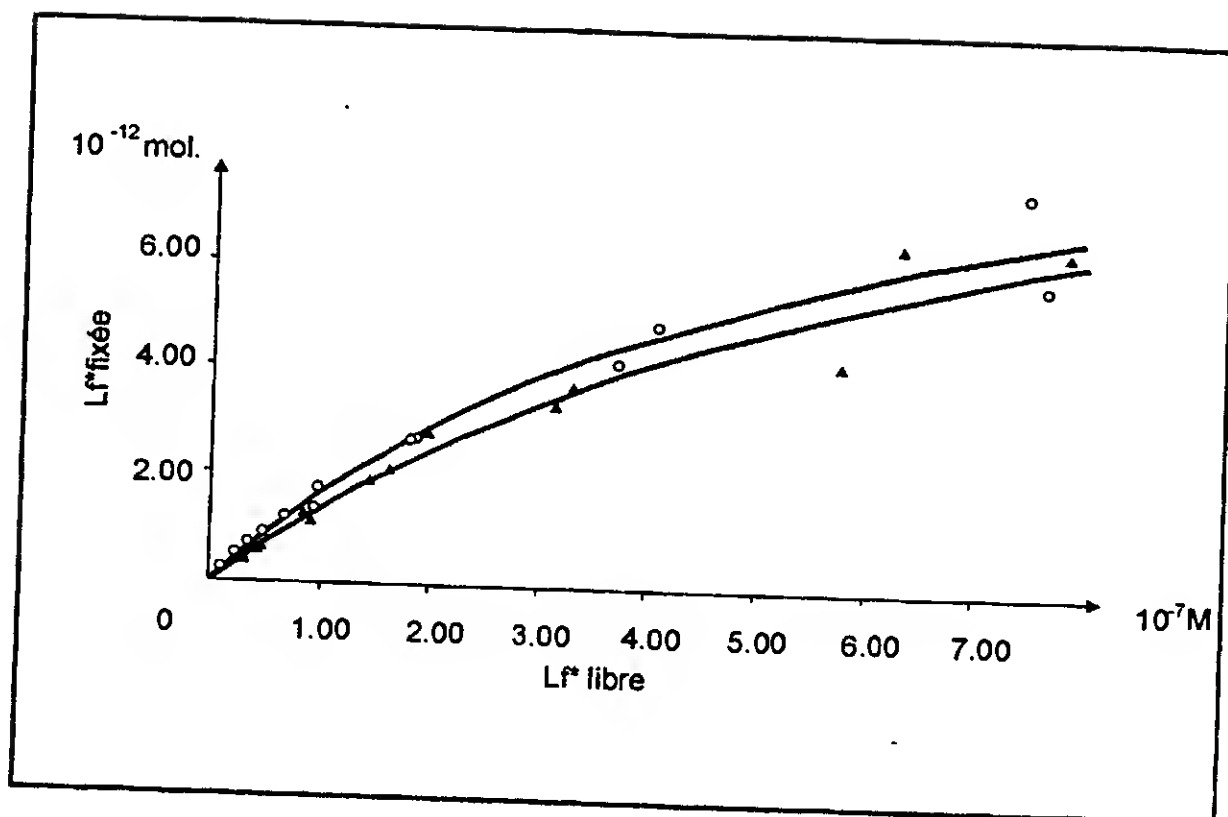


Fig. 7

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
d la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 543017
FR 9705699

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | Revendications concernées de la demande examinée |
|--|---|---|
| Catégorie | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes | |
| X | ZHANG, ZHANYUAN [PH.D.] ET AL: "DEVELOPMENT OF TRANSGENIC PLANTS WITH NON-PLANT ANTIBACTERIAL PROTEIN GENES FOR RESISTANCE TO BACTERIAL PATHOGENS (LACTOFERRIN, NICOTIANA TABACUM, AGROBACTERIUM TUMEFACIENS)" DISSERTATION ABSTRACTS DATABASE ACCESSION NO. 97:3204 & DISSERTATION ABSTRACTS INTERNATIONAL, (1996) VOL. 57, NO. 7B, P. 4124. ORDER NO.: AAR9637086. 185 PAGES., XP002048439 * abrégé * | 1-12 |
| X | --- ZHANG, Z., ET AL.: "Gene transfer for enhancing plant disease-resistance to bacterial pathogens" BIOTECHABS OATBASE ACCESSION NO. 96-00905, XP002048440 * abrégé * & HORTSCIENCE, vol. 30, no. 4, 1995, page 78B | 1-12 |
| X | --- MITRA A ET AL: "Expression of of a human lactoferrin cDNA in tobacco cells produces antibacterial protein(s)." PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE) 106 (3). 1994. 977-981. ISSN: 0032-0889, XP002048441 * le document en entier * | 7,12 |
| X | --- WO 96 37094 A (KOREA INST SCIENCE TECHNOLOGY ;LIU JANG RYOL (KR); LEE KYUNG KWANG) * page 5, ligne 21 - ligne 30 * --- -/-- | 1-12 |
| | | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.C.L.6) |
| | | C12N C07K A01H |
| Date d'achèvement de la recherche | | Examineur |
| 27 novembre 1997 | | Maddox, A |
| <p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p> | | |

1

EPO FORM 1508 (2.02) (publ.15)

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 543017
FR 9705699

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | Revendications concernées de la demande examinée |
|--|--|---|
| Catégorie | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes | |
| X | WARD, P.P., ET AL.: "A system for production of commercial quantities of human lactoferrin: a broad spectrum natural antibiotic" BIOTECHNOLOGY, vol. 13, mai 1995, pages 498-503, XP002048442 * le document en entier * | 7,12 |
| A | WO 95 30339 A (FERRODYNAMICS INC) * page 9 - page 11 * | 12 |
| | | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (InLCLs) |
| | | |
| Date d'achèvement de la recherche | | Examineur |
| 27 novembre 1997 | | Maddox, A |
| <p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p> | | |

1

EPO FORM 1503 02.92 (940515)